



PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP



---

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA  
LABORATÓRIO DE NEUROPSICOFARMACOLOGIA

**Avaliação da Participação dos Receptores N-metil-D-aspartato  
(NMDA) e do Fator de Liberação de Corticotropina (CRF) nos Efeitos  
Aversivos do Óxido Nítrico no Núcleo Intersticial da Estria Terminal  
de Camundongos.**

**Matheus Pegoraro Faria**

Araraquara – SP  
-2015-

**Matheus Pegoraro Faria**

**Avaliação da Participação dos Receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e do Fator de Liberação de Corticotropina (CRF) nos Efeitos Aversivos do Óxido Nítrico no Núcleo Intersticial da Estria Terminal de Camundongos.**

*Dissertação a ser apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas.*

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza**

Araraquara – SP  
-2015-

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F224a Faria, Matheus Pegoraro  
Avaliação da Participação dos Receptores N-metil-D-  
aspartato (NMDA) e do Fator de Liberação de  
Corticotropina (CRF) nos Efeitos Aversivos do Óxido  
Nítrico no Núcleo Intersticial da Estria Terminal de  
Camundongos / Matheus Pegoraro Faria. -- São Carlos  
: UFSCar, 2016.  
69 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de  
São Carlos, 2015.

1. Núcleo intersticial da estria terminal. 2.  
Ansiedade. 3. Óxido nítrico. 4. Labirinto em cruz  
elevado. I. Título.

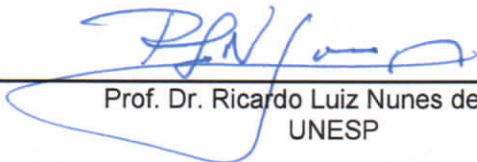



---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Matheus Pegoraro Faria, realizada em 28/05/2015:

  
Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza  
UNESP

  
Profa. Dra. Raquel Vecchio Fornari  
UFABC

  
Profa. Dra. Patricia Maria de Paula  
UNESP

*“Nunca tenha certeza de nada, porque a sabedoria começa com a dívida” – Sigmund Freud*

## **Agradeço:**

Aos meus familiares Nelson, Maria José, Fernanda, Eduardo e Estêvão que sempre apoiaram minhas decisões e compreenderam a minha dedicação nesse trabalho. Por todo seu carinho, sustento, amizade e principalmente pelo amor. Amo vocês!

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza primeiramente, por me aceitar em seu laboratório e tornar possível minha vontade de seguir a carreira acadêmica. Obrigado pela orientação, ensinamentos, paciência e pela amizade ao longo desses anos.

Ao Prof. Dr. Tarciso Tadeu Miguel por todo ensinamento no laboratório e principalmente pela amizade que construímos. Nada disso teria acontecido se não fosse por você. Obrigado!

A Karina por toda sua contribuição nesse trabalho, pelos ensinamentos e, sobretudo, pela amizade.

Aos professores da banca examinadora, pela disposição e contribuição nesse trabalho.

As técnicas do laboratório, Rosana e Elisabete por toda paciência e ensinamentos prestados durante todos esses anos juntos. Vocês são uns anjos.

A secretária Tirene, pelos ótimos serviços prestados, pela sinceridade sempre, pelos cafezinhos e por toda amizade.

Aos professores Carlos, Cleópatra e Marcelo pelo ótimo convívio e pela amizade adquirida dentro do laboratório.

Aos meus amigos de laboratório, Tatiani, Ana Cláudia, Diego, Nathália, Adrielle, Josiane, Leandro, Jefferson, Lucas, Jonas, Willian, Ricardo, Gessynger, Lígia, Paula, Sheila, Paulo, Rodrigo, Fábio. Pela grande amizade e por tornar o ambiente de trabalho sempre mais divertido. Vocês são demais!

Aos meus amigos de Franca Rafael, Luciano, José Eduardo e Douglas pelos grandes momentos vividos. Obrigado por essa amizade verdadeira.

Aos meus amigos da república Quebra Tudo pelas amizades formadas e por tudo que já vivi nessa casa. Com certeza morar ai foi uma das melhores escolhas da minha vida. Obrigado família QT.

A minha namorada Raiane pelo apoio, companheirismo, amizade, paciência e, sobretudo pelo amor. Sua companhia foi essencial para eu atravessar essa etapa da minha vida. Obrigado por tudo linda.

A Cláudia (UNESP) e ao Alexandre (UFSCar) pela assistência prestada na secretaria do programa.

Aos funcionários da FCFar/UNESP pelo apoio prestado durante todos esses anos de faculdade e mestrado.

Ao Programa Interinstitucional de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas pela excelente estrutura e pela oportunidade de realizar esse projeto.

A CAPES pelo apoio financeiro concedido para desenvolver esse trabalho.

Aos camundongos utilizados nesse projeto, cujas vidas foram essenciais para a pesquisa realizada nesse projeto.

E finalmente a Deus, por sua presença em minha vida.

# RESUMO

Os confrontos dos animais com situações que induzem medo e ansiedade resultam em uma série de respostas comportamentais defensivas (ex. luta, fuga, imobilidade, vocalização, etc.), ativação neurovegetativa (ex. taquicardia, elevação da pressão arterial, etc.) e neuroendócrina (ex., liberação de corticosterona). O labirinto em cruz elevado (LCE), um modelo animal de ansiedade, é uma situação que induz várias reações de defesa. Vários estudos têm investigado os substratos neurais e a neurotransmissão envolvidos na neurobiologia das reações de defesa, e o núcleo intersticial da estria terminal (BNST) tem sido uma das estruturas-alvo. Com base no potencial efeito ansiogênico dos neurotransmissores glutamato (via ativação do complexo receptor NMDA-óxido nítrico) e fator liberador de corticotropina (via receptores CRF1), este estudo investigou o papel desses mediadores, através de injeções intra-BNST. Camundongos Suícos machos receberam microinjeção intra-BNST de um doador de óxido nítrico, NOC-9 (0, 18,75, 37,30 e 75,00 nmol) e foram expostos a uma caixa de vidro seguida pelo LCE. Todas as doses provocaram imobilidade registrada na caixa de vidro. No LCE, NOC-9 (37,50 e 75,0 nmol) diminuiu o tempo gasto nos braços abertos, indicando um efeito ansiogênico. NOC-9 também aumentou ansiedade por diminuir frequência de mergulhos e de exploração das extremidades dos braços abertos (medidas complementares). A injeção intra-BNST do antagonista de receptores CRF1, o CP 376395 (0, 0,75, 1,50 e 3,00 nmol) não provocou efeito algum nos índices de ansiedade avaliados pelo LCE. Porém, quando injetado previamente ao NOC-9 este antagonista preveniu seus efeitos ansiogênicos. Contudo, CP 376396 não modificou o tempo de imobilidade causado pelo NOC-9. A injeção intra-BNST do antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, o AP-7 (0, 0,05, 0,10 e 0,20 nmol), na maior dose, provocou um efeito ansiolítico, aumentando a exploração dos braços abertos e



atenuando algumas medidas complementares defensivas (ex., aumentando mergulhos da cabeça e a exploração das extremidades dos braços abertos do LCE. O antagonista NMDA bloqueou os efeitos ansiogênicos eliciados pelo doador de NO, sem, contudo, alterar a imobilidade. Tomados em conjunto, nossos resultados sugerem uma relação importante entre a neurotransmissão nitrérgica, CRFérgica e glutamatérgica no BNST na modulação das reações de defesas em camundongos. Ainda, os mecanismos farmacológicos envolvidos nessa modulação eliciados pela facilitação da transmissão nitrérgica parecem ser dissociados.

# ABSTRACT

It has been shown that the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) of rats contains nitrergic neurons, which are activated during animal exposure to aversive stimuli. BNST is also populated by glutamatergic and corticotrophin releasing factor (CRFergic) neurons, which in turn, are also activated under stressful situations. Here we investigated the anxiogenic-like effects of intra-BNST injections of a nitric oxide (NO) donor, NOC-9, in mice. The role of CRFergic and glutamatergic systems on defensive behavior induced by NOC-9 was investigated with previous intra-BNST infusion of CP376395 (0, 0.75, 1.50 or 3.00 nmol), a CRF type 1 receptor antagonist (CRF1), or AP-7 (0, 0.05, 0.10 or 0.20 nmol), a NMDA receptor antagonist, respectively. Defensive behavior was assessed immediately and 5 minutes after intra-BNST drug injection, exposing mice to an arena (a neutral situation) and to the elevated plus-maze (EPM; an anxiogenic situation), respectively. Results showed that NOC-9 (all doses) provoked immobility assessed in the arena and increased anxiety in the EPM (e.g., decrease in the percentage of open-arm exploration). Despite failing to produce effects on basal levels of anxiety when injected alone (all doses), pretreatment with CP (3.00 nmol) prevented the anxiogenic-like effect of NOC-9 (75.00 nmol) without changing the immobility behavior. Pretreatment with AP-7 (0.05 nmol) produced similar effects, however, when injected alone 0.20 nmol AP-7 attenuated anxiety-like behavior. These results suggest that the CRF1 and NMDA receptors located within the BNST differentially modulate the aversive effects induced by NO production in this limbic forebrain structure.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>1.1. Medo, ansiedade e reações defensivas</b> .....	13
<b>1.2. Substratos neurais envolvidos nas reações de defesa</b> .....	14
<b>1.2.1. Núcleo intersticial da estria terminal</b> .....	14
<b>1.3. Labirinto em Cruz Elevado – LCE</b> .....	15
<b>1.4. Óxido nítrico (NO), glutamato e fator de liberação de corticotropina (CRF)</b> ....	17
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	22
<b>2.1. Objetivo geral</b> .....	22
<b>2.2. Objetivos específicos</b> .....	22
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	23
<b>3.1. Sujeitos</b> .....	23
<b>3.2. Fármacos</b> .....	23
<b>3.3. Cirurgia e administração de fármacos no BNST</b> .....	23
<b>3.4. Análise comportamental</b> .....	24
<b>3.4.1. Imobilidade</b> .....	24
<b>3.4.2. Labirinto em cruz elevado</b> .....	24
<b>3.5. Procedimentos</b> .....	25
<b>3.5.1. Experimento I</b> .....	26
<b>3.5.2. Experimento II</b> .....	26
<b>3.5.3. Experimento III</b> .....	26
<b>3.5.4. Experimento IV</b> .....	26
<b>3.5.5. Experimento V</b> .....	27
<b>3.6. Histologia</b> .....	27

3.7. Estatística.....	27
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
4.1. Injeções no BNST.....	28
4.2. Experimento I: Efeitos da microinjeção intra-BNST de NOC-9 sobre os comportamentos defensivos de camundongos expostos a uma arena e ao LCE.....	28
4.2.1. Análise do tempo de exibição do comportamento de imobilidade.....	29
4.2.2. Avaliação dos efeitos do NOC-9 sobre as medidas espaço-temporais no LCE.....	29
4.2.3. Avaliação dos efeitos do NOC-9 sobre as medidas complementares de camundongos expostos ao LCE.....	30
4.3. Experimento II: Efeitos da microinjeção intra-BNST de CP 376395 sobre os comportamentos defensivos de camundongos expostos ao LCE.....	32
4.3.1. Ausência de efeitos do CP intra-BNST sobre as medidas espaço-temporais de camundongos expostos ao LCE.....	32
4.3.2. Ausência de efeitos do CP intra-BNST sobre as medidas complementares de camundongos expostos ao LCE.....	33
4.4. Experimento III: Avaliação dos efeitos do bloqueio de receptores CRF1 sobre os efeitos aversivos do NOC-9 no BNST.....	34
4.4.1. Análise do tempo de exibição do comportamento de imobilidade.....	35
4.4.2. Avaliação dos efeitos da microinjeção combinada de CP 376395 e NOC-9 no BNST sobre as medidas espaço-temporais no LCE.....	35
4.4.3. Avaliação dos efeitos da microinjeção combinada de CP 376395 e NOC-9 no BNST sobre as medidas complementares no LCE.....	37
4.5. Experimento IV: Efeitos da microinjeção intra-BNST de AP-7 sobre os comportamentos defensivos de camundongos expostos ao LCE.....	40
4.5.1. Efeitos do AP-7 intra-BNST sobre as medidas espaço-temporais de camundongos expostos ao LCE.....	40
4.5.2. Efeitos do AP-7 intra-BNST sobre as medidas complementares de camundongos expostos ao LCE.....	41
4.6. Experimento V: Avaliação dos efeitos do bloqueio de receptores NMDA sobre os efeitos aversivos do NOC-9 no BNST.....	43

4.6.1. Análise do tempo de exibição do comportamento de imobilidade.....	43
4.6.2. Avaliação dos efeitos da microinjeção combinada de AP-7 e NOC-9 no BNST sobre as medidas espaço-temporais no LCE.....	43
4.6.3. Avaliação dos efeitos da microinjeção combinada de AP-7 e NOC-9 no BNST sobre as medidas complementares no LCE.....	45
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>55</b>



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 MEDO, ANSIEDADE E REAÇÕES DEFENSIVAS

Os confrontos dos animais com situações aversivas que induzem medo e ansiedade resultam na expressão de uma série de respostas comportamentais defensivas (luta, fuga, imobilidade, vocalização, etc.), bem como ativação neurovegetativa (taquicardia, elevação da pressão arterial, defecação, etc.) e neuroendócrina (ex., liberação de corticosterona) (Graeff, 1990).

O estudo sistemático da ansiedade e do medo tomou grande impulso a partir dos trabalhos originais de Charles Darwin publicados no seu livro *The Expression of Emotions in Man and Animals* (1872, Apud Zangrossi e Graeff, 2004). A partir de então, a abordagem evolucionária proposta por Darwin tem permeado muitas das teorias sobre a função e a importância que as emoções desempenham para as diferentes espécies. Por esta abordagem, o homem, tendo outros animais como ancestrais, compartilharia com estes suas emoções, possibilitando que comparações entre o seu comportamento e o de outros animais fossem traçadas (Zangrossi e Graeff, 2004).

Com base nesses achados, entende-se que medo e ansiedade são emoções decorrentes das respostas dos animais frente a estímulos aversivos que lhes apresentem perigo ou ameaça à sobrevivência. Tais estímulos, como por exemplo, o ataque de um predador ou alguns confrontos co-específicos, podem resultar na exibição de um repertório de respostas comportamentais e autonômicas, denominadas reações de defesa, coordenadas pela ativação de determinadas áreas encefálicas que juntamente compõem o sistema encefálico de defesa, com objetivo de manter e proteger a vida, (Graeff, 1990). Outros estímulos ambientais, tais como altura excessiva, iluminação intensa, tempestades, incêndio, exposição a lugares novos, também são caracterizados como aversivos aos roedores e podem provocar tais reações, que são compostas por comportamentos de fuga e/ou ataque defensivo (luta), esquiva ativa e inibitória, imobilidade (freezing), avaliação de risco bem como pela ativação autonômica (por exemplo, taquicardia, aumento da pressão arterial) (Blanchard *et al.*, 1993; Blanchard e Blanchard, 2003).

Estas reações, somadas às alterações endógenas como liberação de hormônios e neurotransmissores [ex., adrenalina, CRF (fator de liberação de corticotropina)/ ACTH (hormônio adrenocorticotrófico)/ cortisol, glutamato, etc.], sinalizam que o organismo estará preparado para responder àquela ameaça, seja fugindo ou enfrentando-a,

dependendo da natureza da ameaça e a estratégia adotada. Esse preparo abrange a exibição das reações acima citadas, sendo todas elas ferramentas importantes para preservação da vida.

Embora tais alterações sejam importantes diante de um contexto ou situação aversivos, tornam-se mal-adaptadas em condições que não oferecem perigo nem hostilidade ao indivíduo. Em se tratando da espécie humana, estas respostas defensivas eliciadas na ausência de situações ameaçadoras podem indicar a ocorrência de transtornos de ansiedade (Gray e Mcnaughton, 2000; Blanchard *et al.*, 2001; Mcnaughton e Corr, 2004).

## **1.2 SUBSTRATOS NEURAIIS ENVOLVIDOS NAS REAÇÕES DE DEFESA**

Embora haja numerosos estudos relacionando comportamentos defensivos com o medo e a ansiedade (Yang *et al.*, 2004; Markham *et al.*, 2006; Litvin *et al.*, 2007), a compreensão da função e da importância das vias neurais e neurotransmissores envolvidos na modulação dessas respostas ainda é carente de investigação.

O hipotálamo, a matéria cinzenta periaquedutal (MCP) e a amígdala são reconhecidos como importantes estruturas do sistema encefálico de defesa, mediando reações de fuga e luta, ativação autonômica e antinocicepção, participando diretamente da modulação de reações características de ansiedade e medo (Bandler e Depaulis, 1991; Fanselow, 1991; Graeff *et al.*, 1993; Behbehani, 1995; Carrive *et al.*, 1997; Lang *et al.*, 1998; Lovick, 2000; Brandao *et al.*, 2003; Walker e Carrive, 2003). Dentre as regiões supracitadas, destaca-se a amígdala, uma estrutura prosencefálica que desempenha função crítica em vários componentes das respostas defensivas, como imobilidade, sobressalto, antinocicepção e alterações na frequência cardíaca. Corroborando essa informação, lesões dos núcleos central, lateral e basolateral da amígdala resultam na interrupção dessas respostas (Rosen e Schulkin, 1998). Mcnaughton e Corr (2004), postularam que o estado de medo envolveria estruturas mais caudais, como por exemplo, o hipotálamo medial e a matéria cinzenta periaquedutal, enquanto o estado de ansiedade teria influência de estruturas do chamado sistema de inibição comportamental (SIC) que abrange o sistema septo-hipocampal, amígdala, córtex préfrontal medial, entre outras.

### **1.2.1 Núcleo intersticial da estria terminal**



A amígdala estendida compreende estruturas límbicas do prosencéfalo basal, incluindo-se o núcleo intersticial da estria terminal (do inglês: bed nucleus of stria terminalis, BNST), uma área encefálica pertencente ao estudo da ansiedade, haja vista o envolvimento de neurotransmissores nesta estrutura na mediação de respostas comportamentais e autonômicas frente ao estresse, medo e ansiedade (Davis, 1998; Alheid, 2003; Heimer, 2003; Schulkin *et al.*, 2005; Sahuque *et al.*, 2006). Neste sentido, foi demonstrado que a estimulação elétrica do BNST em ratos promoveu alterações comportamentais e endócrinas similares àquelas evocadas pelo estresse (Dunn, 1987; Casada e Dafny, 1991), enquanto a inativação farmacológica deste núcleo diminui a expressão de respostas condicionadas ou incondicionadas a estímulos aversivos, denotando a função desta área também nas respostas inatas (Sahuque *et al.*, 2006).

### **1.3 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO - LCE**

O estudo das reações de defesa tem levado a um crescente interesse pelo desenvolvimento de modelos animais voltados à investigação de estados emocionais potencialmente associados a desordens psiquiátricas. Além disso, a demanda por novos modelos também tem sido motivada por diversos entraves éticos, metodológicos e econômicos decorrentes do estudo em humanos de determinados processos psicofisiológicos e psicopatológicos. Dessa forma, torna-se clara a contribuição dos testes em animais para a compreensão da neurobiologia de diversos distúrbios mentais/emocionais (Zangrossi e Graeff, 2004).

Várias investigações utilizam a exposição de animais a uma situação potencialmente ameaçadora para então observar as reações de defesa desencadeadas pelo estado emocional durante a exposição ao aparato. No presente estudo foi utilizado o labirinto em cruz elevado (LCE; Figura 1), um modelo animal de ansiedade originalmente descrito por Pellow *et al.* (1985), usando ratos como sujeitos experimentais, sendo posteriormente validado para camundongos (Stephens *et al.*, 1986; Lister, 1987). Este modelo, frequentemente usado para avaliar a ansiedade bem como o potencial ansiolítico ou ansiogênico de fármacos, baseia-se na aversão natural de roedores a espaços abertos e abrange o estudo dos padrões exploratórios em um aparato simples, compreendendo quatro braços, dos quais dois têm paredes (braços fechados) e dois não as têm (braços abertos). Os níveis de ansiedade são avaliados pela esquivas aos braços abertos (porcentagem de entradas nos braços abertos - %EA e porcentagem de tempo nos braços abertos - %TA), ao passo que a atividade geral é avaliada pela

frequência absoluta de entrada nos braços fechados – BF (Pellow *et al.*, 1985; Rodgers e Cole, 1994). Por este motivo, o LCE é amplamente utilizado na busca da compreensão dos mecanismos neurobiológicos subjacentes à ansiedade e ao medo (Handley e Mithani, 1984; Pellow *et al.*, 1985; Lister, 1987; Rodgers e Cole, 1994).

Por avaliar a aversão de roedores diante de uma situação com características que lembram àquelas encontradas na natureza, o LCE tem sido considerado um modelo de ansiedade etologicamente fundamentado (Carobrez e Bertoglio, 2005). Este modelo elicia no animal reações de conflito, associadas, por um lado, aos instintos exploratórios (reconhecimento do ambiente) e, por outro, à aversão desencadeada pelos locais abertos (Pellow *et al.*, 1985). Nessa condição o animal tem seu sistema de defesa e/ou de inibição comportamental ativados.

Em animais tratados com fármacos ansiolíticos de reconhecida eficácia clínica em humanos, como os benzodiazepínicos, observa-se um aumento significativo no número de entradas e na permanência nos braços abertos, sem, contudo ocorrerem alterações na frequência de entradas nos braços fechados, um importante parâmetro usado para indicar variação da atividade locomotora do animal (Pellow *et al.*, 1985; Rodgers e Cole, 1994). Assim, este resultado é interpretado como um efeito ansiolítico seletivo, ou seja, desacompanhado de efeito sedativo. Já em animais tratados com drogas ansiogênicas em seres humanos, observa-se uma diminuição na exploração relativa dos braços abertos, também sem alteração do número de entradas nos braços fechados, demonstrando intensificação da aversão ao ambiente potencialmente perigoso. Entretanto, em alguns casos pode haver diminuição também na frequência de entradas nos braços fechados, possivelmente porque a ansiedade resulta em inibição comportamental generalizada (Guimaraes *et al.*, 2005).



Figura 1 - Fotografia ilustrando o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) para camundongos.

#### 1.4 ÓXIDO NÍTRICO (NO), GLUTAMATO E FATOR DE LIBERAÇÃO DE CORTICOTROPINA (CRF)

Diferentes neurotransmissores estão envolvidos na mediação da ansiedade e de seus transtornos, através da ação em diferentes estruturas encefálicas, algumas delas destacadas anteriormente. Dentre eles, podemos citar a serotonina, a noradrenalina, o ácido gama amino butírico (GABA) e o glutamato, bem como os chamados neurotransmissores atípicos, como os endocanabinóides e o óxido nítrico (Esplugues, 2002; Howlett *et al.*, 2002; Piomelli, 2003; Guimaraes *et al.*, 2005; Fogaca *et al.*, 2012). O óxido nítrico é um gás inorgânico incolor, radical livre de vida curta, representado pela fórmula NO (nitrogênio e oxigênio), que possui um elétron desemparelhado em sua órbita externa, o que o torna quimicamente reativo, tendendo a reagir com outras moléculas como o oxigênio e radicais livres liberados em diversas situações (Guix *et al.*, 2005). Bastante presente no organismo, o NO é considerado um neurotransmissor atípico por suas características físico-químicas particulares (Gally *et al.*, 1990), como sua alta difusibilidade, permitindo que atravessasse facilmente as membranas biológicas, o que promove sua ação em sítios além de onde foi produzido/liberado. Além disso, ele não é armazenado em vesículas, sendo produzido quando necessário e rapidamente degradado, devido a sua meia-vida curta de poucos segundos (Schweighofer e Ferriol, 2000).

O NO é produzido sob ação de uma enzima, a NOS (óxido nítrico sintetase), através de uma reação entre o oxigênio molecular e L-arginina (desaminação oxidativa de seu grupo guanidina), tendo como cofator a molécula de fosfato reduzido de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) (Mayer *et al.*, 1991; Lohse *et al.*, 1998), produzindo, além de NO, uma molécula de L-citrulina (bastante utilizada como método indireto de investigação da produção de NO). O NO é rapidamente degradado, podendo ser oxidado a íon nitroso ( $\text{NO}^+$ ) ou reduzido a íon nitróxido ( $\text{NO}^-$ ) (Dawson e Dawson, 1996a; b). Além disso, pode se ligar a biomoléculas circulantes como tióis, resíduos de cisteína, ânions superóxido e hemoglobina (Yun *et al.*, 1997). O NO forma complexos com ânions para formar peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ), que se decompõem em outros radicais livres como íons hidróxido e  $\text{NO}_2$ . Esses radicais livres parecem participar da morte neuronal decorrente de processos isquêmicos e estresse oxidativo (Radi *et al.*, 1991)

Quanto à sua ação, o NO pode atuar de diferentes modos, sendo o principal a sua propriedade de ativar a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), que, por sua vez,

catalisa a conversão de trifosfato de guanossina (GTP) em monofosfato cíclico de guanossina (GMPc), formando o complexo NO/GMPc. A ligação do NO ao grupo heme dessa enzima provoca uma alteração conformacional que aumenta em até 200 vezes a taxa catalítica de conversão do GTP em GMPc (Friebe e Koesling, 2003). Esse aumento de GMPc induzido pelo NO pode desencadear uma série de reações intracelulares, como alteração direta da permeabilidade de canais iônicos sensíveis a esse composto (Nakamura e Gold, 1987; Kaupp, 1991), modificar a atividade de fosfodiesterases (PDE) dependentes de GMPc, seja estimulando-a (família II, PDE estimulada por GMPc) ou inibindo-a (família III, PDE inibida por GMPc e família IV, PDE ligada ao GMPc), dependendo da família da PDE (Charbonneau *et al.*, 1990), ou ainda ativar proteínas quinases dependentes de GMPc (PKG) (Schmidt *et al.*, 1993; Friebe e Koesling, 2003; Krumenacker *et al.*, 2004).

Além das evidências que apontam para o envolvimento da transmissão glutamatérgica sobre a liberação de NO, outros estudos indicam ser o NO um mensageiro retrógrado (difunde-se da célula pós-sináptica para a pré-sináptica) o qual provoca retro-alimentação positiva na liberação de glutamato, através de um mecanismo GMPc dependente (Nowicky e Bindman, 1993). Além de sua ação sobre o glutamato, o NO parece estar também envolvido direta ou indiretamente na liberação de outros neurotransmissores, como o GABA (ácido gama-amino-butírico), acetilcolina, serotonina, noradrenalina, dopamina, neuropeptídeos, histamina e purinas. Porém, seu papel em muitos casos é dual e depende de sua concentração (Prast e Philippu, 2001).

Sendo assim, o NO pode modificar uma variedade de funções encefálicas, tais como a regulação da excitabilidade neuronal, da plasticidade sináptica, LTP ou LTD (potenciação ou depressão de longo prazo respectivamente), neurotoxicidade (excitotoxicidade), neuroproteção, liberação de hormônios (Prast e Philippu, 2001), ansiedade e comportamento defensivo (Guimaraes *et al.*, 2005), entre outros.

Com relação à neurotransmissão glutamatérgica envolvendo ansiedade e comportamentos de defesa, estudos prévios demonstraram que microinjeções de agonistas de glutamato na matéria cinzenta periaquedutal, parte dorsal, (MCPd) são eficazes em produzir reações comportamentais de defesa bem como aumento da expressão de proteína Fos, um marcador funcional da atividade neuronal (Bandler, 1988; Bandler e Carrive, 1988; Ferreira-Netto *et al.*, 2005). Por outro lado, antagonistas de receptores glutamatérgicos NMDA (N-metil-D-aspartato) e não NMDA exercem

efeito ansiolítico em ratos submetidos ao LCE (Guimaraes *et al.*, 1991; Matheus e Guimaraes, 1997; Hall e Behbehani, 1998; Molchanov e Guimaraes, 2002).

Existem evidências sugestivas de que a ação ansiogênica dos aminoácidos excitatórios (AAEs – dentre os quais, o principal é o glutamato) está relacionada com a síntese de óxido nítrico, possivelmente induzida quando receptores glutamatérgicos, principalmente NMDA (Garthwaite *et al.*, 1988), mas também o alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazol propiónico (AMPA), Cainato e metabotrópicos (Wood *et al.*, 1990; Southam *et al.*, 1991; Okada, 1992), são ativados. De fato, o NO pode atuar na ansiedade, como observado em estudos que demonstraram que a administração sistêmica (Faria *et al.*, 1997) ou intra-MCP de L-NAME (N $\omega$ -nitro-L-arginina-metil-éster) e L-NOARG (N $\omega$ -nitro-L-arginina), ambos inibidores não seletivos da óxido nítrico sintase (NOS), presente na MCP (Vincent e Kimura, 1992; Onstott *et al.*, 1993), atenua a ansiedade avaliada no LCE em ratos (Guimaraes *et al.*, 1994; De Oliveira *et al.*, 1997; De Oliveira *et al.*, 2001). Ainda neste sentido, Guimaraes *et al.* (2005) demonstraram que a microinjeção intra-MCPd de um sequestrador de NO, o 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-óxido-3-óxido (Carboxi-PTIO), atenua a ansiedade em ratos expostos ao LCE. Por outro lado, foi observado que microinjeções de doadores de NO na MCP dorsal, como o cloreto de 3-morfolinomina (SIN-1) e dietilamina do óxido nítrico (DEA/NO), provocam reações de fuga em ratos (De Oliveira *et al.*, 2000).

Com relação à interação NO/Glutamato, Miguel e Nunes-De-Souza (2006) observaram que os efeitos comportamentais como saltos, corrida e imobilidade, bem como antinociceptivo, provocados pela injeção intra-MCP de NMDA (agonista de receptores de mesmo nome; dose 0,04 nmol/0,1  $\mu$ l) foram completamente bloqueados pela injeção do inibidor específico da enzima NOSn, o NPLA (N $\omega$ -propil-L-arginina), no mesmo sítio. Ainda neste contexto, injeções intra-MCPd de AP-7 e NBQX, antagonistas de receptores glutamatérgicos NMDA e AMPA/Cainato, respectivamente, inibiram a resposta de fuga eliciada pelo SIN-1, um doador de NO (Moreira *et al.*, 2004).

Tomadas em conjunto, tais evidências são sugestivas de que o NO pode interferir na modulação de respostas defensivas na MCPd, sendo possível que esteja envolvido na modulação do medo/ansiedade desencadeado pela ativação de receptores NMDA na MCP.

Além do glutamato, outro composto, o fator de liberação de corticotropina (CRF – do inglês “corticotropin-releasing factor”), tem despertado interesse em diversos grupos de pesquisa devido ao seu comprovado envolvimento na excitabilidade neuronal. O CRF é um peptídeo com 41 aminoácidos produzido no hipotálamo, sendo inicialmente conhecido por sua função na via ou eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenais (HPA), estimulando a secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na hipófise anterior (pituitária). O ACTH, por sua vez, estimula a produção de glicocorticóides no córtex das adrenais. No entanto, estudos anatômicos utilizando anticorpos para CRF identificaram vários sítios no encéfalo de ratos que contêm altas densidades de neurônios CRFérgicos, incluindo núcleos amigdalóides, hipocampo, núcleo dorsal da rafe, locus coeruleus (LC) e MCP (Swanson *et al.*, 1983; Merchenthaler, 1984). Tais evidências foram corroboradas por Van Pett *et al.* (2000), que identificaram presença de RNA-m codificadores para receptores CRF nestas regiões, que incluem áreas envolvidas no processamento do medo, ansiedade e de informações nociceptivas, caracterizando a importância do desenvolvimento de pesquisas sobre o papel do CRF na antinocicepção induzida por situações ameaçadoras e aversivas.

Com a descoberta de neurônios CRFérgicos extra-hipotalâmicos, as investigações não mais se restringiram à sua função endócrina, ultrapassando as fronteiras das regiões hipotalâmicas. Neste sentido, além do seu papel endócrino, o CRF comporta-se como um regulador parácrino ou neurotransmissor, modulando respostas comportamentais defensivas frente a estímulos aversivos de modo aparentemente independente da ativação do eixo HPA, pois tais respostas são insensíveis a hipofisectomia e ao tratamento com dexametasona (Britton *et al.*, 1986; Berridge e Dunn, 1989).

Existem evidências de que os receptores para o CRF são acoplados à proteína Gs (estimulatória), que estimula a via do AMPc-PKA, sendo subdivididos em dois subtipos, o CRF1 (Chang *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1993; Vita *et al.*, 1993) e o CRF2 (Lovenberg *et al.*, 1995; Perrin *et al.*, 1995). Camundongos nocaute para receptores CRF1 apresentaram redução da ansiedade, sugerindo sua participação na modulação desse estado emocional (Smith *et al.*, 1998; Timpl *et al.*, 1998). Além disso, foi demonstrado que as ações excitatórias mediadas pela estimulação dos receptores CRF1 são bloqueadas por seus antagonistas (Baram *et al.*, 1997). Bowers *et al.* (2003) mostraram que a aplicação de CRF na MCP de ratos produziu aumento significativo na taxa de disparos espontâneos das células estudadas. Esse aumento na excitabilidade

celular foi também observado em outras regiões. Quanto ao subtipo CRF2, seu papel nos comportamentos eliciados pelo medo/ ansiedade não está claro, existindo trabalhos contraditórios quanto a sua participação (Bale *et al.*, 2000; Kishimoto *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2001).

O efeito excitatório produzido pelo CRF tem sido associado com a despolarização da membrana, porém os mecanismos de sua ação sobre a excitabilidade celular e sobre a ansiedade ainda não estão elucidados. Tem sido sugerido que as ações do CRF estariam associadas com o aumento da permeabilidade celular aos íons Na<sup>+</sup> e Ca<sup>++</sup> (Bowers *et al.*, 2003). Este estudo demonstrou que microinjeções de CRF em regiões envolvidas na mediação da ansiedade como a MCP, aumentavam significativamente a frequência tanto de potenciais excitatórios pós-sinápticos (PEPS) quanto de potenciais inibitórios pós-sinápticos (PIPS), o que faz do efeito excitatório do CRF, um fenômeno generalizado e não específico para determinado tipo de neurônio na MCP. Devido a esses efeitos, postulou-se que o CRF poderia estar agindo na MCP, aumentando a liberação de óxido nítrico, uma vez que esse possui ação generalizada de liberação tanto de transmissores inibitórios como o GABA quanto excitatórios como o glutamato (Hall e Behbehani, 1998). Assim, um mecanismo de ação plausível para o CRF estaria relacionado ao aumento da concentração intracelular de cálcio mediado pelo AMPc/PKA e posterior abertura de canais de cálcio, causando excitabilidade celular e ativação da NOSn, resultando na produção e liberação de óxido nítrico que por sua vez agiria na liberação de vários transmissores dentro da MCP. Desta forma, os efeitos inibitórios e excitatórios observados com infusões intra-MCP de CRF seriam explicados pelo aumento da liberação de GABA e glutamato, respectivamente, na própria MCP (Hall e Behbehani, 1998).

Com relação ao BNST, pouco se conhece a respeito da ação do NO/glutamato bem como do CRF na modulação das reações de defesa. Entretanto, estudos anteriores demonstraram que o BNST de ratos contém neurônios nitrérgicos, os quais são ativados após exposição ao gato, como estímulo aversivo (Guimaraes *et al.*, 2005; Beijamini e Guimaraes, 2006). Além disso, foram identificados neurônios glutamatérgicos (Mcelligott e Winder, 2008) bem como CRFérgicos (Cummings *et al.*, 1983; Swanson *et al.*, 1983; Sakanaka *et al.*, 1987; Ju *et al.*, 1989; Morin *et al.*, 1999) nesta região. Assim, torna-se relevante investigar a participação do NO nas reações de defesa em camundongos (através da administração intra-BNST de compostos doadores de NO),

bem como a possível participação do glutamato e do CRF nas respostas comportamentais induzidas pela facilitação nitrérgica nesta estrutura.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da facilitação nitrérgica (através de um doador de NO - NOC-9), no núcleo intersticial da estria terminal sobre o comportamento de camundongos expostos ao LCE bem como avaliar o envolvimento de receptores CRF1 e NMDA na mediação das respostas induzidas pelo NOC-9.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar os efeitos da injeção intra-BNST de NOC-9, um doador de NO, sobre os comportamentos defensivos de camundongos expostos a uma arena e ao LCE (Experimento I);
- Avaliar os efeitos da injeção intra-BNST de CP 376395 e AP-7, antagonistas de receptores CRF1 e NMDA, respectivamente, sobre os comportamentos defensivos de camundongos expostos ao LCE (Experimentos II e IV);
- Investigar o papel dos receptores CRF1 e NMDA, através da injeção prévia intra-BNST de CP 376395 e AP-7, sobre os efeitos aversivos eliciados pela injeção de NOC-9 em camundongos expostos a uma arena e ao LCE (Experimentos III e V).



### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 SUJEITOS**

Camundongos Suíços albinos machos, pesando entre 25-35g. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ), umidade ( $55 \pm 5\%$ ) e luz (ciclo 12/12 horas, luzes acesas às 07h00min) e tiveram livre acesso ao alimento e a água, exceto durante os curtos períodos de teste no LCE.

Os protocolos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa local (CEP/FCF/CAR-UNESP: número de protocolo 09/2011).

#### **3.2 FÁRMACOS**

Os fármacos utilizados foram o NOC-9 (6-(Hidroxi-1-metil-2-nitrosodiazirino)-N-metil-1-hexanamina), um doador de óxido nítrico (Tocris Cookson Inc., Ballwin, USA), CP 376395 [cloridrato de *N*-(1-etilpropil)-3,6-dimetil-2-(2,4,6-trimetilfenoxi)-4-piridinamina], antagonista de receptores CRFérgicos subtipo 1 (Tocris Cookson Inc., Ballwin, USA) e AP-7 (ácido 2-amino-7-fosfo-heptanóico), antagonista de receptores glutamatérgicos NMDA. As doses foram determinadas em experimentos pilotos e baseadas em estudos anteriores (Sahuque *et al.*, 2006; Nunes-De-Souza *et al.*, 2010). O NOC-9 foi dissolvido numa solução TRIS com pH 10,0 para evitar a formação de NO até a droga atingir o tecido cerebral (Seccia *et al.*, 1996) e as outras drogas foram dissolvidas em solução salina 0,9% que foi usada como controle.

#### **3.3 CIRURGIA E ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS NO BNST**

Camundongos foram submetidos à cirurgia estereotáxica para receber implante intracraniano de cânula guia (26 gauge - aço inoxidável) de 7,0 mm de comprimento, após anestesia com a associação de anestésico + relaxante muscular, Cetamina + Xilazina (100 e 10 mg/Kg, respectivamente). A cânula foi fixada no crânio do animal com cimento acrílico e as coordenadas estereotáxicas para implantação da cânula guia objetivando atingir o BNST do animal foram baseadas no Atlas de Paxinos e Franklin (2001). As coordenadas foram: 0,5 mm anterior e 3,0 mm lateral (bilateral) ao bregma

(encontro das suturas) e 3,2 mm ventral à superfície do crânio, num ângulo de 32°. A ponta da cânula guia foi posicionada + 1,0 mm dorsal à estrutura alvo. Imediatamente depois da cirurgia, os animais receberam injeção intramuscular de penicilina-G benzatina (Pentabiótico, 56,7 mg/kg num volume de 0,1 mL; Fort Dodge, Campinas, SP, Brazil) e uma injeção subcutânea do analgésico anti-inflamatório Banamine (0,5 mg/kg flunixinina meglumina num volume de 0,3mL).

A injeção das soluções no BNST foi feita de cinco a sete dias após a cirurgia e ocorreu através da inserção de uma agulha (33 gauge) de 8,0 mm de comprimento no interior da cânula guia em cada hemisfério, conectada, por meio de um tubo de polietileno (PE-10), a uma micro-seringa 2 µL (marca Hamilton). Após a microinjeção, a agulha de injeção permaneceu por mais 30 segundos no interior da cânula guia para garantir escoamento e infusão e durante todo o procedimento de injeção o animal foi contido manualmente pelo experimentador com uso de uma flanela. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno durante as injeções confirmou o fluxo da solução.

### **3.4 ANÁLISE COMPORTAMENTAL**

#### **3.4.1 Imobilidade**

No começo deste estudo nós observamos que injeções de NOC-9 no BNST causavam imobilidade nos camundongos por aproximadamente 120 segundos após a administração da droga. Sendo que a imobilidade é um comportamento defensivo observado depois de injeções de doadores de NO em estruturas do sistema cerebral de defesa (Moreira *et al.*, 2004; Guimaraes *et al.*, 2005; Joca e Guimaraes, 2006; Miguel *et al.*, 2012), decidimos gravar o tempo gasto (em segundos) na exibição deste comportamento como uma medida de resposta defensiva induzida pelo NOC-9. Assim, imediatamente após da injeção de NOC-9 no BNST, os camundongos foram colocados individualmente numa arena de vidro (30 x 20 x 25 cm) e o tempo gasto na imobilidade foi medido durante 5 minutos. Depois deste tempo, cada camundongo foi exposto ao LCE. A imobilidade foi definida como ausência completa de movimentos exceto a respiração, onde o animal exibia uma postura tensa.

#### **3.4.2 Labirinto em cruz elevado**

O labirinto em cruz elevado (LCE) é similar ao descrito por Lister (1987) o qual consiste de dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) unidos ortogonalmente a dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm), elevados 38,5 cm do solo por um suporte de madeira. As paredes dos braços fechados são de vidro transparente e o assoalho de fórmica.

Uma câmera filmadora ligada a um aparelho de DVD e a uma TV, foi posicionada para gravar os experimentos, registrando todos os comportamentos do animal para posterior análise, utilizando o software “X-Plo-Rat 2005”, desenvolvido pelo grupo do Dr. Morato na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP (o software pode ser baixado gratuitamente no <http://scotty.ffclrp.usp.br/X-Plo-Rat.html>).

Os seguintes comportamentos foram registrados: porcentagem de entradas nos braços abertos - número de vezes em que o animal cruzava com as quatro patas linha divisória de cada braço [(entrada nos braços abertos/total de entradas) x 100], porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos [(tempo no braço aberto/300) x 100] - utilizados como índices de ansiedade; frequência de entradas nos braços fechados – medida de locomoção (número de vezes em que o animal cruzava com as quatro patas linha divisória de cada braço). Além da análise espaço-temporal acima descrita, foram analisadas as seguintes medidas complementares no LCE:

a. Mergulho com a cabeça (HD: do inglês “head dipping”, movimento de inclinar a cabeça além dos limites do aparato em direção para o solo da sala experimental) em compartimento não protegido (braços abertos, HD desprotegido) ou protegido (centro do aparato, HD Protegido).

b. Comportamento de esticar-se (SAP: do inglês “stretched-attend postures”, movimento com o tronco e cabeça para frente esticando-se e retornando à posição inicial sem concluir o passo a frente com as patas traseiras), também realizado em compartimento não protegido (braços abertos, SAP desprotegido) ou protegido (centro do aparato, SAP Protegido).

c. Frequência de entradas na porção distal dos braços abertos (exploração dos 10 cm distais dos braços abertos)

d. Frequência de levantamentos (postura do animal em posição bípede com as patas dianteiras apoiadas ou não nas paredes dos braços fechados ou no centro do aparelho).

### **3.5 PROCEDIMENTOS**

Todos os experimentos foram realizados de 5 a 7 dias após a cirurgia estereotáxia, e os animais foram levados à sala experimental por pelo menos meia hora antes do início do teste, para habituação. Os testes foram conduzidos durante a fase clara do ciclo de luz, em uma sala com baixa iluminação (1 x 60 W).

### **3.5.1 Experimento I: Microinjeção intra-BNST de NOC-9 e avaliação dos comportamentos defensivos de camundongos expostos a uma arena e ao LCE.**

Os animais receberam microinjeção bilateralmente de NOC-9 (0; 18,75; 37,50 e 75,00 nmol) intra-BNST. Imediatamente depois da injeção, cada animal foi colocado numa arena de vidro para analisar o comportamento de imobilidade por 5 minutos. Logo em seguida, cada animal foi exposto ao LCE e os índices de ansiedade (% entrada e % tempo nos braços abertos), locomoção (entrada braços fechados) bem como as medidas complementares (HD, SAP, entrada porção final braços abertos e levantamento) foram registrados durante 5 minutos.

### **3.5.2 Experimento II: Efeitos da microinjeção intra-BNST do antagonista do receptor CRF-1 sobre os comportamentos de camundongos expostos ao LCE.**

Os animais receberam microinjeção bilateralmente de CP 376395 (0; 0,75; 1,50 ou 3,00 nmol) intra-BNST. Dez minutos depois, cada animal foi exposto ao LCE para registro das medidas espaço-temporais e complementares durante 5 minutos.

### **3.5.3 Experimento III: Efeito do CP 376395 intra-BNST sobre os efeitos comportamentais produzidos pela injeção local de NOC-9.**

Os animais receberam microinjeção bilateralmente de CP 376395 (pré-tratamento; 0 ou 3,00 nmol) intra-BNST e, 10 minutos depois, outra microinjeção, agora de NOC-9 (tratamento; 0 ou 75,00 nmol) no mesmo sítio. Imediatamente após a injeção de NOC-9, cada animal foi colocado numa arena de vidro para registro do comportamento de imobilidade por 5 minutos. Logo em seguida, cada animal foi exposto ao LCE durante 5 minutos para registro das medidas espaço-temporais e complementares.

### **3.5.4 Experimento IV: Efeitos da microinjeção intra-BNST do antagonista do receptor glutamatérgico do tipo NMDA sobre os comportamentos de camundongos expostos ao LCE.**

Os animais receberam microinjeção bilateralmente de AP-7 (0; 0,05; 0,10 ou 0,20 nmol) intra-BNST. Dez minutos depois, cada animal foi exposto ao LCE para registro das medidas espaço-temporais e complementares durante 5 minutos.

### **3.5.5 Experimento V: Efeito do AP-7 intra-BNST sobre os efeitos comportamentais produzidos pela injeção local de NOC-9.**

Os animais receberam microinjeção bilateralmente de AP-7 (pré-tratamento; 0 ou 0,05 nmol) intra-BNST e 10 minutos depois receberam microinjeção de NOC-9 (tratamento; 0 ou 75,00 nmol) no mesmo sítio. Imediatamente após a injeção de NOC-9, cada animal foi colocado numa arena de vidro para registro do comportamento de imobilidade por 5 minutos. Logo em seguida, cada animal foi exposto ao LCE durante 5 minutos para registro das medidas espaço-temporais e complementares.

## **3.6 HISTOLOGIA**

Após o término dos experimentos, todos os animais receberam injeção de uma solução de 1% de azul de Evans no BNST, de acordo com o procedimento descrito para a injeção de fármacos (item 3.3). Em seguida, foi realizada a eutanásia dos animais em uma câmara de CO<sub>2</sub>, depois foram decapitados e tiveram seus encéfalos removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%) para posteriormente serem realizadas secções coronais ao longo do trajeto da cânula com o uso de um criostato (Leica CM 1850). As secções foram inspecionadas com o uso de um microscópio (Leica DMLB) e a visualização da dispersão do azul de Evans foi considerada indicativa do local da injeção.

## **3.7 ESTATÍSTICA**

Todos os resultados foram inicialmente submetidos ao teste de homogeneidade de Levene. Nos casos em que se caracterizaram a heterogeneidade das variâncias, os resultados foram convertidos em Log de base 10. Posteriormente, os resultados foram submetidos à análise de variância ANOVA unifatorial nos experimentos I, II e IV (fator: tratamento) e bifatorial nos experimentos III e V (fator 1: pré-tratamento / fator 2: tratamento). Nos casos de valores significantes de *P*, foram realizadas comparações post-hoc múltiplas de Duncan. Valores de *P* iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 INJEÇÕES NO BNST

A Figura 2 mostra um diagrama esquemático (esquerda) de um encéfalo de camundongo fundamentado no atlas de Paxinos e Franklin (2001), indicando o sítio de microinfusão de drogas no BNST e uma fotomicrografia de uma seção coronal da região prosencefálica de um sujeito representativo (direita), mostrando um sítio de injeção no BNST de um camundongo.

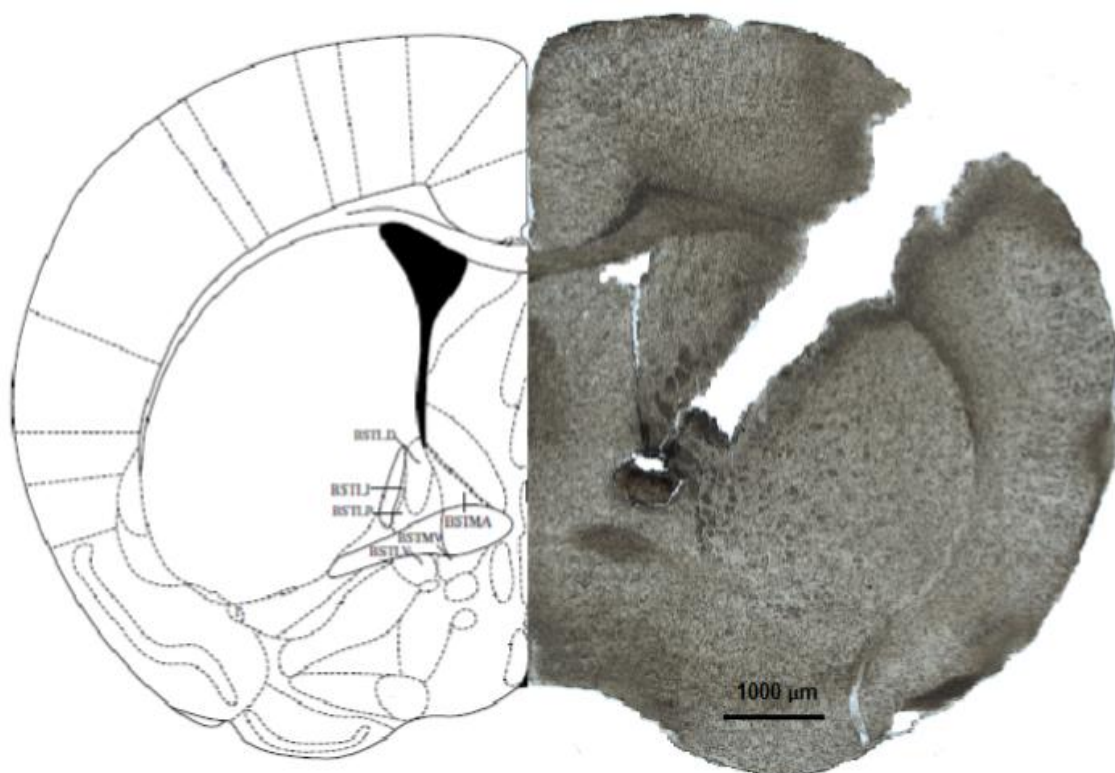


Figura 2: (Esquerda) representação esquemática de um sítio de microinfusão (círculo) no BNST de camundongo. (Direita) fotomicrografia de uma seção coronal de um sujeito representativo, mostrando um sítio de injeção no BNST de um camundongo. Tendo o bregma como referência, as seções ocorreram de +0,62 mm a -0,34 mm. (Legenda – BST: núcleo intersticial da estria terminal; LD: lateral-dorsal; LJ: lateral-justacapsular; LP: lateral-posterior; MA: medial-anterior; MV: medial-ventral; LV: lateral-ventral).

### 4.2 EXPERIMENTO I: EFEITOS DA MICROINJEÇÃO INTRA-BNST DE NOC-9 SOBRE OS COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS A UMA ARENA E AO LCE.

#### 4.2.1 Análise do tempo de exibição do comportamento de imobilidade

A Figura 3 mostra os efeitos da microinjeção intra-BNST de NOC-9 (0; 18,75; 37,50 ou 75,00 nmol) sobre o comportamento de imobilidade em camundongos expostos a uma arena de vidro. A ANOVA unifatorial revelou significância para o fator tratamento ( $F_{3,33} = 5,87$ ;  $p < 0,05$ ). A análise post hoc revelou que todas as doses de NOC-9 foram significativamente diferentes do grupo controle (veículo).

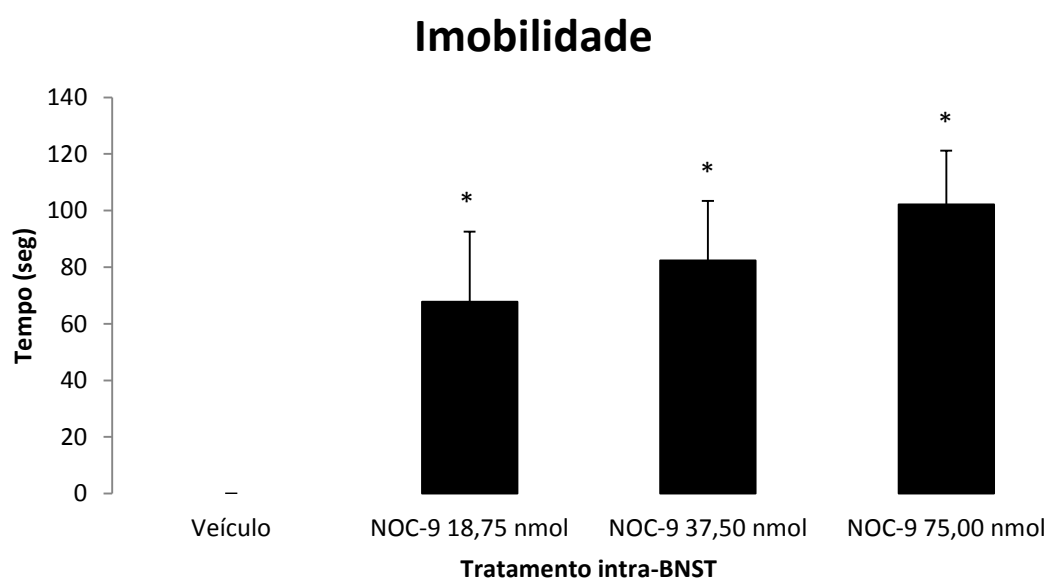


Figura 3: Efeitos da microinjeção de NOC-9 (0; 18,75; 37,50 ou 75,00 nmol/0,2  $\mu$ L) no BNST de camundongos sobre o tempo em segundos de exibição do comportamento de imobilidade. As colunas representam as médias ( $\pm$  EPM). N = 8-10 animais por grupo. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo veículo.

#### 4.2.2 Avaliação dos efeitos do NOC-9 sobre as medidas espaço-temporais no LCE

A Figura 4 mostra os efeitos da microinjeção intra-BNST de NOC-9 (0; 18,75; 37,50 ou 75,00 nmol) sobre os índices de ansiedade e locomoção dos camundongos expostos ao LCE. A ANOVA unifatorial revelou significância para o fator tratamento apenas para porcentagem de tempo nos braços abertos ( $F_{3,33} = 3,27$ ;  $p < 0,05$ ). A análise post hoc confirmou redução no tempo gasto nos braços abertos do LCE do grupo que recebeu NOC-9 intra-BNST nas doses de 37,50 e 75,00 nmol em comparação ao grupo veículo ( $p < 0,05$ ). Não houve significância para o índice de locomoção (entradas nos braços fechados –  $F_{3,33} = 0,21$ ;  $p > 0,05$ ).

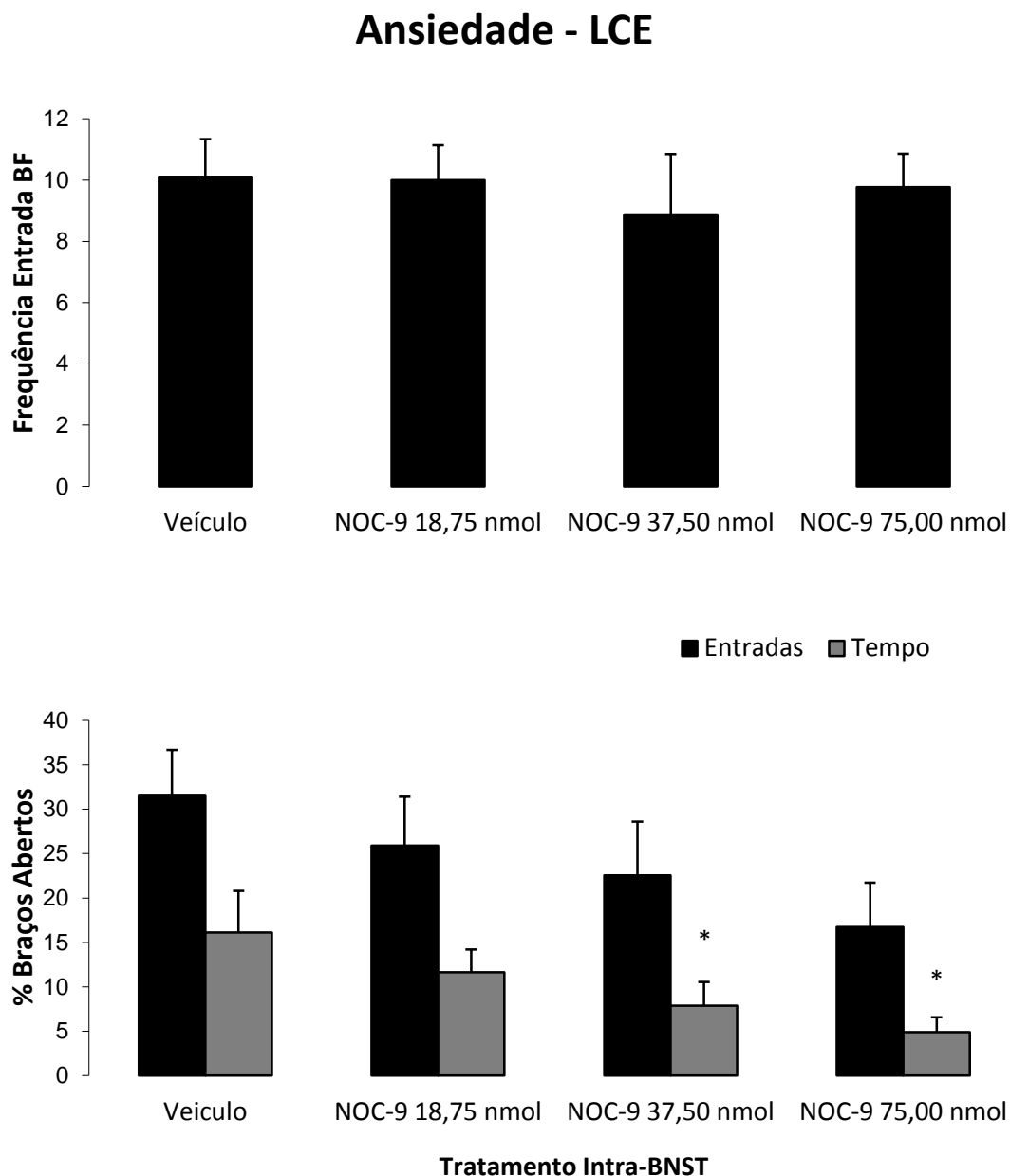


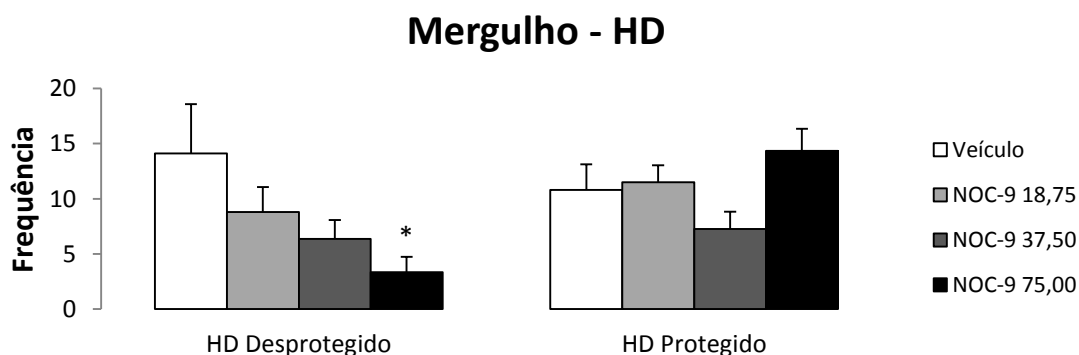
Figura 4: Efeitos da microinjeção de veículo ou NOC-9 (18,75; 37,50 ou 75,00 nmol/0,2  $\mu$ l) no BNST de camundongos sobre a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos (inferior) e a frequência de entradas nos braços fechados (BF) do LCE (superior). As colunas representam as médias ( $\pm$  EPM). N = 8-10 animais por grupo. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo veículo.

#### 4.2.3 Avaliação dos efeitos do NOC-9 sobre as medidas complementares de camundongos expostos ao LCE

A Figura 5 mostra os efeitos da injeção de NOC-9 (0; 18,75; 37,50 e 75,00 nmol) sobre as medidas complementares analisadas: HD desprotegido, HD protegido,



SAP desprotegido, SAP protegido, frequência de entradas na extremidade dos braços abertos e frequência de levantamentos. ANOVA unifatorial indicou tendência a efeito da injeção de NOC-9 no BNST para o comportamento de mergulhar com a cabeça nos braços abertos do LCE (área desprotegida, HD desprotegido;  $F_{3,33} = 2,52$ ;  $p = 0,07$ ; Figura 5). Análises post hoc (teste de Duncan) indicaram que a dose de 75,00 nmol diminuiu a exibição deste comportamento ( $p < 0,05$ ). Com relação ao comportamento de mergulhar com a cabeça nas áreas protegidas (HD protegido), não houve diferenças significativas entre os grupos e o controle ( $F_{3,33} = 2,09$ ;  $p > 0,05$ ; Figura 5). Com relação ao comportamento de esticar-se, ANOVA unifatorial não revelou efeito da injeção de NOC-9 no BNST para este comportamento, tanto na área desprotegida como na área protegida do LCE (área desprotegida, SAP desprotegido;  $F_{3,33} = 1,97$ ; área protegida, SAP protegido;  $F_{3,33} = 1,53$ ;  $p > 0,05$ ; Figura 5). A Figura 5 também mostra os comportamentos de frequência de entradas na extremidade dos braços abertos e de levantamentos. A ANOVA unifatorial indicou tendência a efeito da injeção de NOC-9 no BNST para a frequência de entradas na extremidade dos braços abertos do aparato ( $F_{3,33} = 2,39$ ;  $p = 0,08$ ; Figura 5). Análises post hoc (teste de Duncan) indicaram que apenas a dose de 75,00 nmol diminuiu a exibição deste comportamento ( $p < 0,05$ ), comparado ao grupo veículo. Com relação aos levantamentos a ANOVA não demonstrou diferenças significativas ( $F_{3,33} = 1,94$ ;  $p > 0,05$ ).



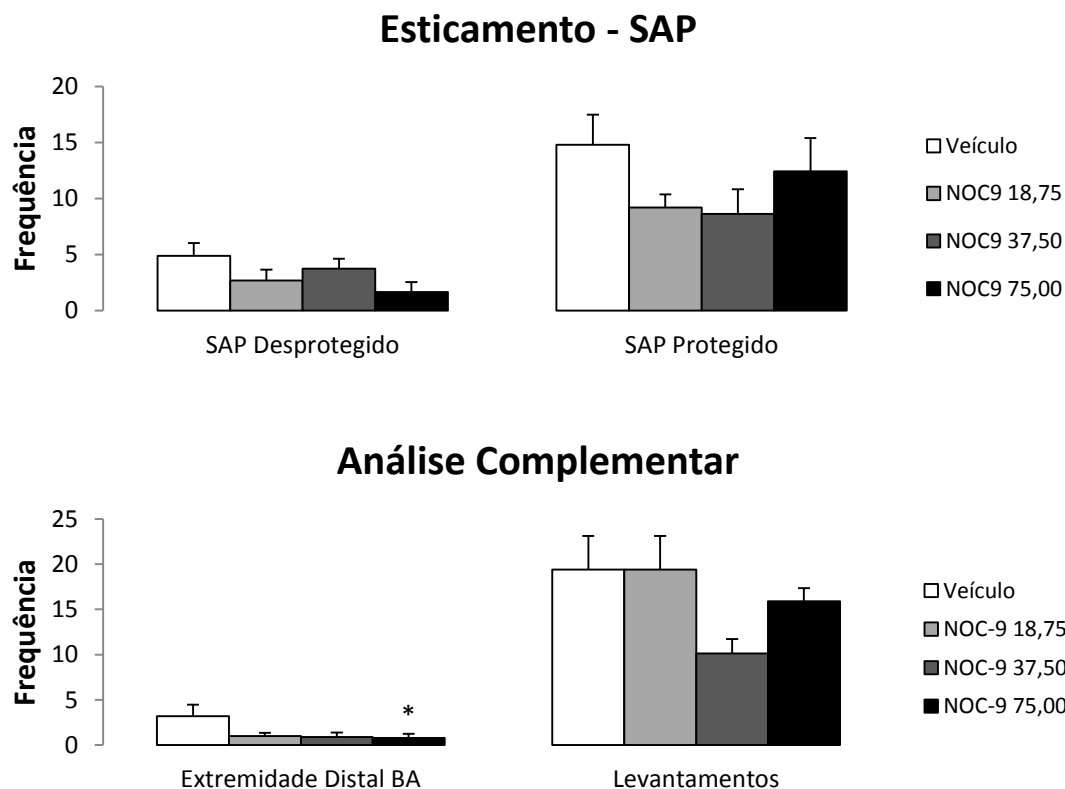


Figura 5: Efeitos da microinjeção de NOC-9 (0, 18,75, 37,50 ou 75,00 nmol/0,2  $\mu$ L) no BNST de camundongos sobre o comportamento de mergulhar com a cabeça (HD), de esticar-se (SAP) bem como a frequência de entradas na extremidade dos braços abertos do LCE e de levantamentos. As colunas representam as médias ( $\pm$  EPM). N = 8-10 animais por grupo. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo veículo.

### 4.3 EXPERIMENTO II: EFEITOS DA MICROINJEÇÃO INTRA-BNST DE CP 376395 SOBRE OS COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO LCE.

#### 4.3.1 Ausência de efeitos do CP intra-BNST sobre as medidas espaço-temporais de camundongos expostos ao LCE

A Figura 6 mostra os índices de ansiedade (porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos) avaliados em animais submetidos ao LCE após receberem injeção intra-BNST de CP 376395 (0, 0,75, 1,50 ou 3,00 nmol). A ANOVA monofatorial seguida do teste de comparações múltiplas de Duncan revelou que a injeção de CP, em todas as doses, não alterou a porcentagem de entradas ( $F_{3,31} = 0,04$ ;  $p > 0,05$ ) tampouco de tempo gasto ( $F_{3,31} = 0,75$ ;  $p > 0,05$ ) nos braços abertos do LCE. ANOVA também não revelou diferenças significativas para a frequência de entradas nos braços fechados do aparato ( $F_{3,31} = 0,60$ ;  $p > 0,05$ ).

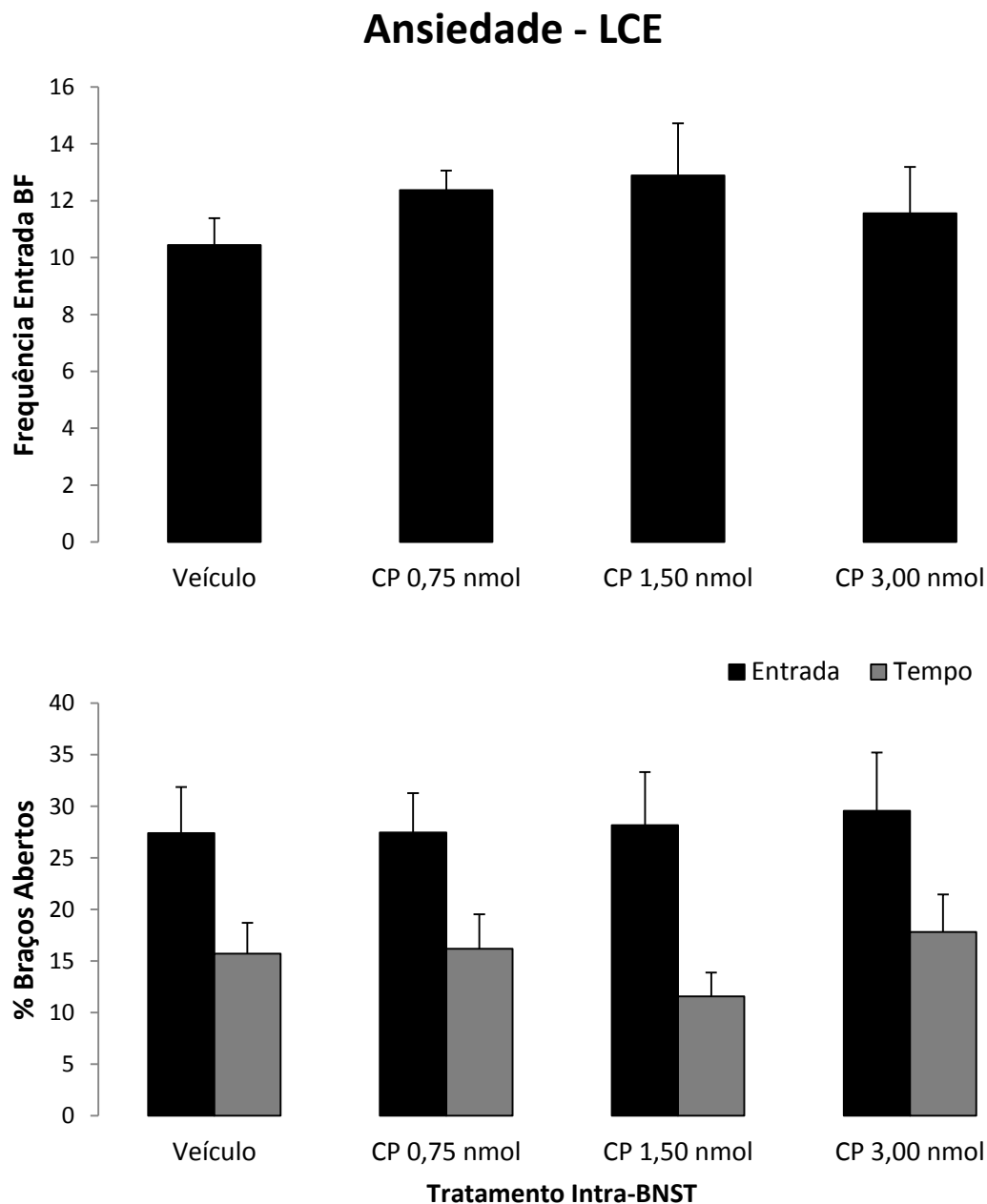


Figura 6: Ausência de efeitos da microinjeção de veículo ou CP (0,75; 1,50 ou 3,00 nmol/0,2  $\mu$ l) no BNST de camundongos sobre a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos (inferior) e a frequência de entradas nos braços fechados (BF) do LCE (superior). As colunas representam as médias ( $\pm$  EPM). N = 8-9 animais por grupo.

#### 4.3.2 Ausência de efeitos do CP intra-BNST sobre as medidas complementares de camundongos expostos ao LCE

A Figura 7 mostra os efeitos da injeção de CP 376395 (0, 0,75, 1,50 ou 3,00 nmol) sobre as medidas complementares analisadas: HD desprotegido, HD protegido, SAP desprotegido, SAP protegido, frequência de entradas na extremidade dos braços abertos

e frequência de levantamentos. ANOVA monofatorial seguida do teste post hoc de Duncan indicou que a injeção de CP, em todas as doses, não demonstrou diferenças significativas nesses comportamentos.

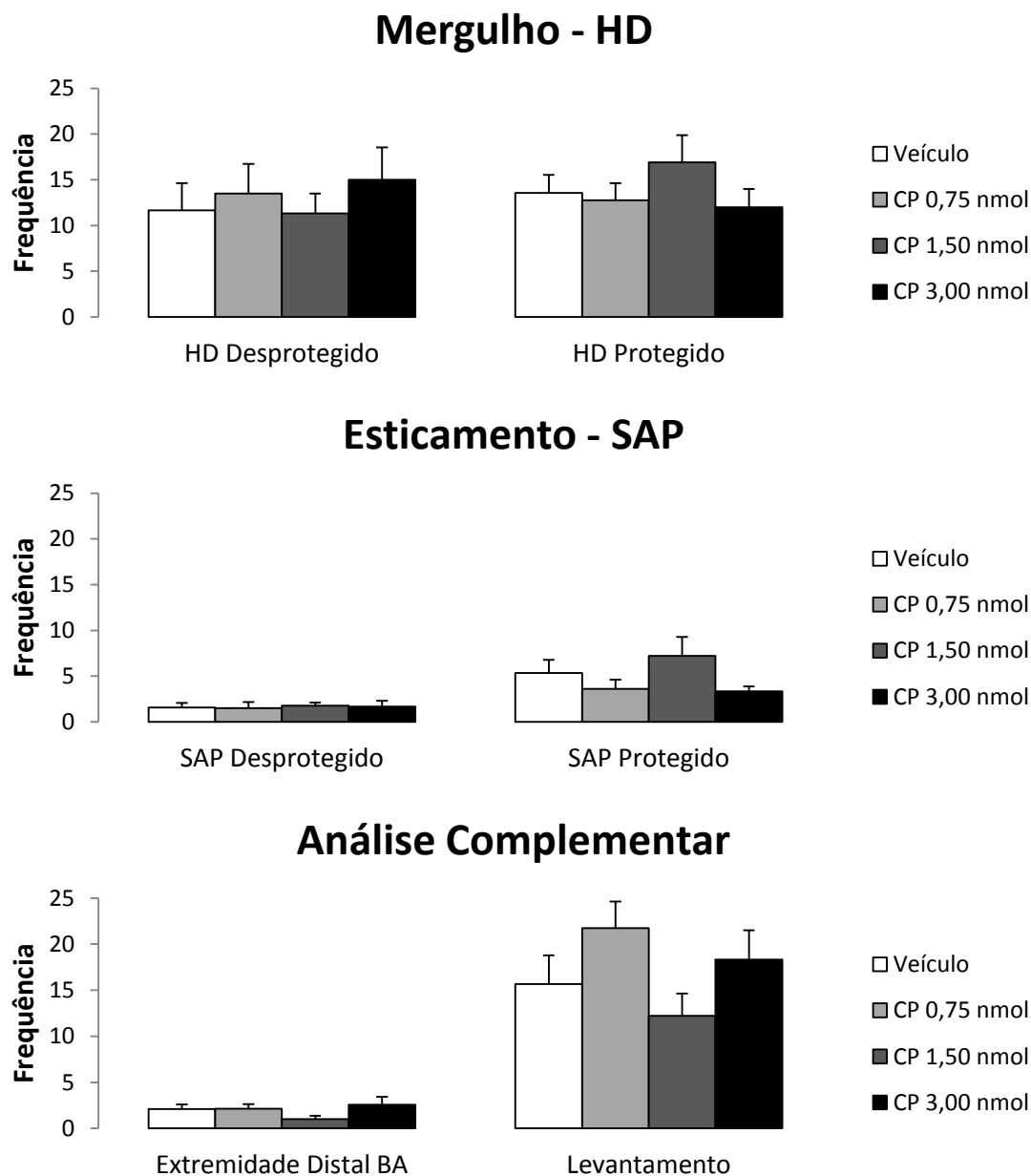


Figura 7: Ausência de efeitos da microinjeção de CP 376395 (0, 0,75, 1,50 ou 3,00 nmol/0,2  $\mu$ L) no BNST de camundongos sobre o comportamento de mergulhar com a cabeça (HD), de esticar-se (SAP) bem como a frequência de entradas na extremidade dos braços abertos (EDBA) do LCE e de levantamentos. As colunas representam as médias ( $\pm$  EPM). N = 8-9 animais por grupo.

#### 4.4 EXPERIMENTO III: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO BLOQUEIO DE RECEPTORES CRF1 SOBRE OS EFEITOS AVERSIVOS DO NOC-9 NO BNST

#### 4.4.1 Análise do tempo de exibição do comportamento de imobilidade

ANOVA bifatorial não revelou diferenças estatísticas no pré-tratamento ( $F_{1,26}=0,81$ ;  $p>0,05$ ), mas revelou no tratamento ( $F_{1,26}=124,03$ ;  $p<0,05$ ). Na interação entre os fatores não houve diferenças significativas ( $F_{1,26}=0,81$ ;  $p>0,05$ ). Comparações posteriores (teste de Duncan) revelaram que mais uma vez o NOC-9 promoveu a exibição do comportamento de imobilidade (grupo salina + NOC-9) e que a injeção prévia de CP (3,00 nmol) não foi eficaz em atenuar este comportamento provocado pelo NOC-9 no BNST (grupo CP + NOC-9; Figura 8).

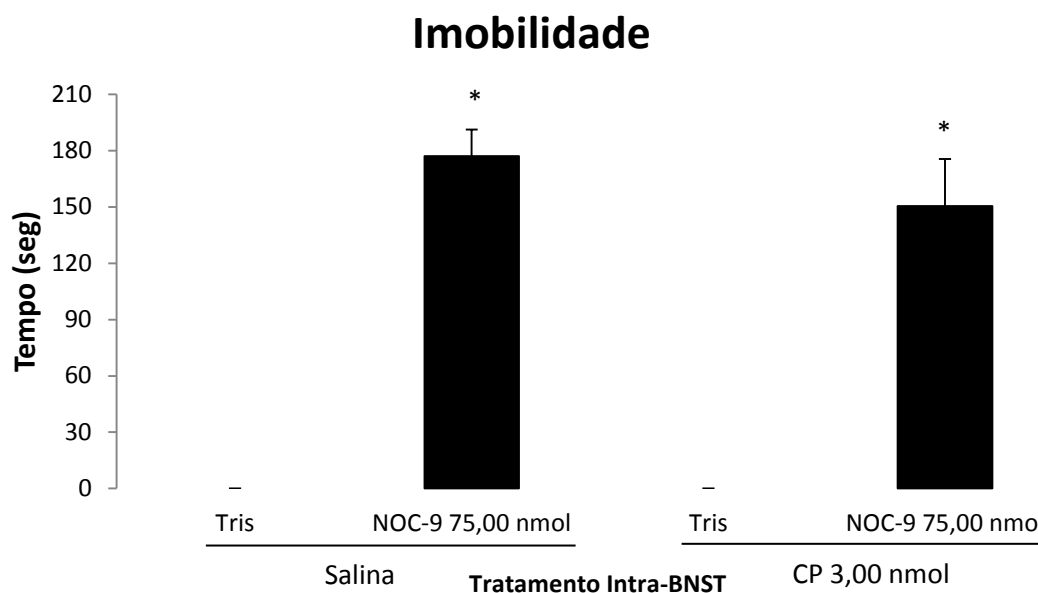


Figura 8: Efeitos das microinjeções combinadas de CP 376395 (3,00 nmol/0,2  $\mu$ L) e NOC-9 (75,00 nmol/0,2  $\mu$ L) no BNST de camundongos sobre tempo em segundos de exibição do comportamento de imobilidade. As colunas representam as médias ( $\pm$  EPM). N = 6-9 animais por grupo. \* $p<0,05$  comparado ao grupo salina-tris.

#### 4.4.2 Avaliação dos efeitos da microinjeção combinada de CP 376395 e NOC-9 no BNST sobre as medidas espaço-temporais no LCE

A Figura 9 mostra as análises espaço-temporais (frequência de entrada nos braços fechados e a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos) avaliadas em animais submetidos ao LCE após receberem injeção prévia intra-BNST de CP

376395 (3,00 nmol) seguido (10 minutos após) de injeção intra-BNST de NOC-9 (75,00 nmol). ANOVA bifatorial da frequência de entradas nos braços fechados não revelou diferenças estatísticas no pré-tratamento ( $F_{1,26} = 0,67$ ;  $p > 0,05$ ), bem como no tratamento ( $F_{1,26} = 1,44$ ;  $p > 0,05$ ). Na interação entre os fatores, também não houve diferença significativa ( $F_{1,26} = 0,41$ ;  $p > 0,05$ ). Comparações posteriores (teste de Duncan) revelaram que a injeção combinada não alterou a frequência de entradas entre os grupos e o controle Salina + Tris. ANOVA bifatorial da porcentagem de entradas nos braços abertos revelou diferenças estatísticas no pré-tratamento ( $F_{1,26} = 4,29$ ;  $p < 0,05$ ), como também no tratamento ( $F_{1,26} = 7,57$ ;  $p < 0,05$ ) mas não indicou interação entre os fatores ( $F_{1,26} = 2,26$ ;  $p > 0,05$ ). Comparações posteriores (teste de Duncan) revelaram que a injeção combinada de Salina + NOC-9 foi significativamente diferente do grupo controle Salina + Tris. Mostrou também que a porcentagem de entradas, nesses braços, do grupo CP + NOC-9 foi significativamente diferente do grupo Salina + NOC-9. O efeito do NOC-9 75,00 nmol foi revertido pela injeção prévia de CP 3,00 nmol. Com relação ao tempo de permanência nos braços abertos a ANOVA bifatorial revelou diferenças estatísticas para os fatores pré-tratamento ( $F_{1,26} = 4,59$ ;  $p < 0,05$ ), tratamento ( $F_{1,26} = 5,39$ ;  $p < 0,05$ ), bem como uma tendência de efeito para a interação entre os fatores ( $F_{1,26} = 3,75$ ;  $p = 0,06$ ). Comparações posteriores (teste de Duncan) revelaram que a injeção combinada, alterou a porcentagem de tempo de permanência do grupo Salina + NOC-9 em relação ao grupo controle Salina + Tris. Mostrou também que a porcentagem de tempo de permanência, nesses braços, do grupo CP + NOC-9 foi significativamente diferente do grupo Salina + NOC-9. O efeito do NOC-9 75,00 nmol foi revertido pela injeção prévia de CP 3,00 nmol.

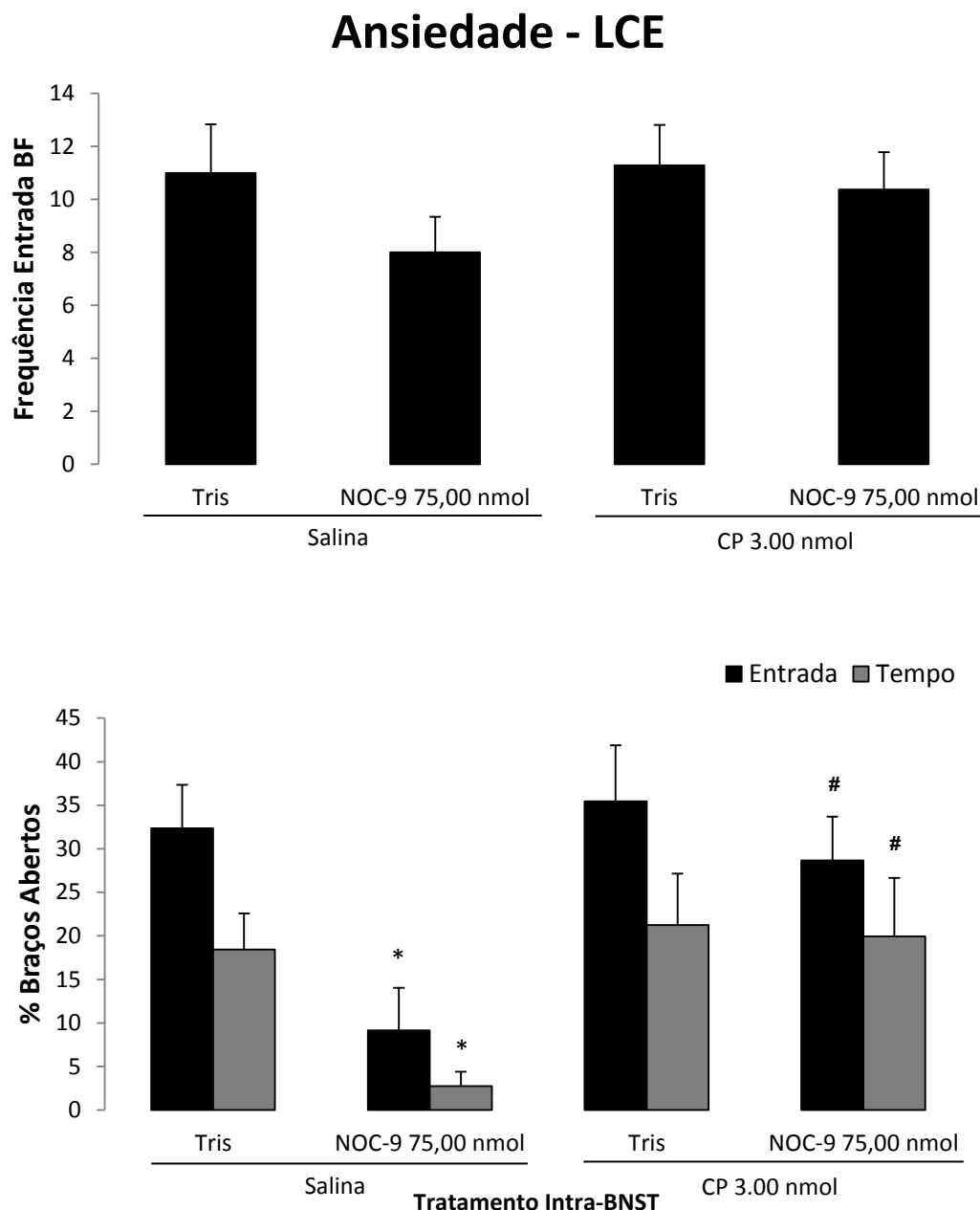


Figura 9: Efeitos da microinjeção combinada de CP 376395 (3,00 nmol/0,2  $\mu$ L) e NOC-9 (75,0 nmol/0,2  $\mu$ L) no BNST de camundongos sobre a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos (inferior) e a frequência de entradas nos braços fechados (EBF) do LCE (superior). As colunas representam as médias ( $\pm$  EPM). N = 6-9 animais por grupo. \* $p$  < 0,05 comparado ao grupo salina-tris e # $p$  < 0,05 comparado ao grupo salina-NOC-9.

#### 4.4.3 Avaliação dos efeitos da microinjeção combinada de CP 376395 e NOC-9 no BNST sobre as medidas complementares no LCE

As Figuras 10, 11 e 12 mostram os efeitos da injeção combinada de CP 376395 (3,00 nmol) e NOC-9 (75,00 nmol) sobre as medidas complementares analisadas: HD

desprotegido, HD protegido, SAP desprotegido, SAP protegido, frequência de entradas na extremidade dos braços abertos e frequência de levantamentos. ANOVA bifatorial não indicou efeito significativo no pré-tratamento ( $F_{1,26} = 3,10$ ;  $p > 0,05$ ), mas indicou no tratamento ( $F_{1,26} = 4,74$ ;  $p < 0,05$ ), na interação entres os fatores não houve efeito significativo ( $F_{1,26} = 2,30$ ;  $p > 0,05$ ) para o comportamento de mergulhar com a cabeça nos braços abertos do LCE (área desprotegida, HD desprotegido; Figura 10). Análises post hoc (teste de Duncan) revelaram que houve uma diminuição da exibição deste comportamento do grupo Salina + NOC-9 em relação ao grupo controle Salina + Tris,  $p < 0,05$ . Mostrou também que a exibição desse comportamento do grupo CP + NOC-9 foi significativamente diferente do grupo Salina + NOC-9,  $p < 0,05$ . O efeito do NOC-9 75,00 nmol foi revertido pela injeção prévia de CP 3,00 nmol. Com relação ao HD nas áreas protegidas (HD protegido), não houve diferenças significativas no pré-tratamento ( $F_{1,26} = 0,0009$ ;  $p > 0,05$ ), no tratamento ( $F_{1,26} = 0,68$ ;  $p > 0,05$ ) e também na interação entre os fatores ( $F_{1,26} = 0,80$ ;  $p > 0,05$ ; Figura 10).

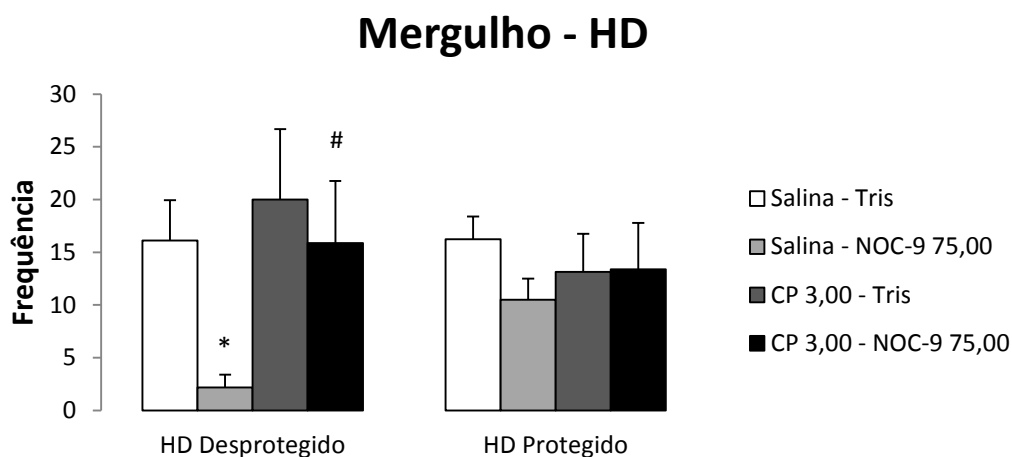


Figura 10: Efeitos da microinjeção combinada de CP 376395 (3,00 nmol/0,2  $\mu$ L) e NOC-9 (75,00 nmol/0,2  $\mu$ L) no BNST de camundongos sobre o comportamento de mergulhar com a cabeça (HD). As colunas representam as médias ( $\pm$  EPM). N = 6-9 animais por grupo.\* $p < 0,05$  comparado ao grupo salina-tris e # $p < 0,05$  comparado ao grupo salina-NOC-9 75,00.

ANOVA bifatorial não indicou efeito significativo no pré-tratamento ( $F_{1,26} = 0,83$ ;  $p > 0,05$ ), mas revelou no tratamento ( $F_{1,26} = 5,76$ ;  $p < 0,05$ ). Na interação entres os fatores não houve diferenças significativas ( $F_{1,26} = 3,13$ ;  $p > 0,05$ ) para o comportamento de esticar-se nos braços abertos do LCE (área desprotegida, SAP desprotegido; figura 11). Análises post hoc de Duncan indicaram que a injeção combinada de CP e NOC-9, nos grupos Salina + NOC-9 e CP + NOC-9, reduziu o comportamento de esticar-se



(SAP) nos braços abertos do LCE ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle Salina + Tris. O efeito do NOC-9 75,00 nmol não foi revertido pela injeção prévia de CP 3,00 nmol. Com relação ao SAP nas áreas protegidas (SAP protegido), houve diferenças significativas no pré-tratamento ( $F_{1,26} = 4,46$ ;  $p < 0,05$ ) mas não no tratamento ( $F_{1,26} = 2,95$ ;  $p > 0,05$ ) bem como na interação entre os fatores ( $F_{1,26} = 2,11$ ;  $p > 0,05$ ; Figura 11). Análises post hoc de Duncan revelaram que a injeção combinada, no grupo Salina + NOC-9, aumentou o comportamento de esticar-se nas áreas protegidas do LCE ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle Salina + Tris. Mostrou também que o comportamento de esticar-se do grupo CP + NOC-9, foi significamente diferente do grupo Salina + NOC-9. Mostrando que o efeito do NOC-9 75,00 nmol foi revertido pela injeção prévia de CP 3,00 nmol.

### Esticamento - SAP

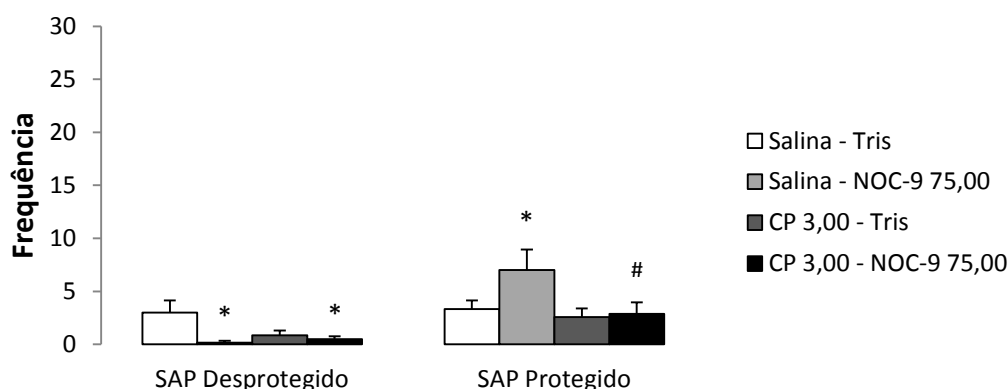


Figura 11: Efeitos da microinjeção combinada de CP 376395 (3,00 nmol/0,2  $\mu$ L) e NOC-9 (75,00 nmol/0,2  $\mu$ L) no BNST de camundongos sobre o comportamento de esticar-se (SAP). As colunas representam as médias ( $\pm$  EPM). N = 6-9 animais por grupo. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo salina-NOC-9 e # $p < 0,05$  comparado ao grupo salina-NOC-9 75,0.

A Figura 12 mostra os comportamentos de frequência de entradas na extremidade dos braços abertos e de levantamentos. Com respeito à primeira variável, ANOVA bifatorial não indicou efeito significativo no pré-tratamento ( $F_{1,26} = 3,04$ ;  $p > 0,05$ ), mas revelou no tratamento ( $F_{1,26} = 7,00$ ;  $p < 0,05$ ). Não houve alteração significativa na interação entre os grupos ( $F_{1,26} = 0,20$ ;  $p > 0,05$ ) para o comportamento de frequência de entradas na extremidade final dos braços abertos (figura 12). Análises post hoc de Duncan indicaram que a injeção combinada, não alterou o comportamento dos grupos tratados em relação ao grupo controle Salina + Tris. Com relação ao levantamento, não houve diferenças significativas no pré-tratamento ( $F_{1,26} = 0,12$ ;  $p >$

0,05) mas houve no tratamento ( $F_{1,26} = 11,77$ ;  $p < 0,05$ ), bem como na interação entre os fatores ( $F_{1,26} = 4,26$ ;  $p < 0,05$ ; Figura 12). Análises post hoc de Duncan indicaram que a injeção combinada de CP e NOC-9, reduziu o comportamento de levantar dos grupos Salina + NOC-9 e CP + NOC-9 no LCE ( $p < 0,05$ ) comparado com o grupo controle Salina + Tris. O efeito do NOC-9 75,00 nmol não foi revertido pela injeção prévia de CP 3,00 nmol.

## Análise Complementar

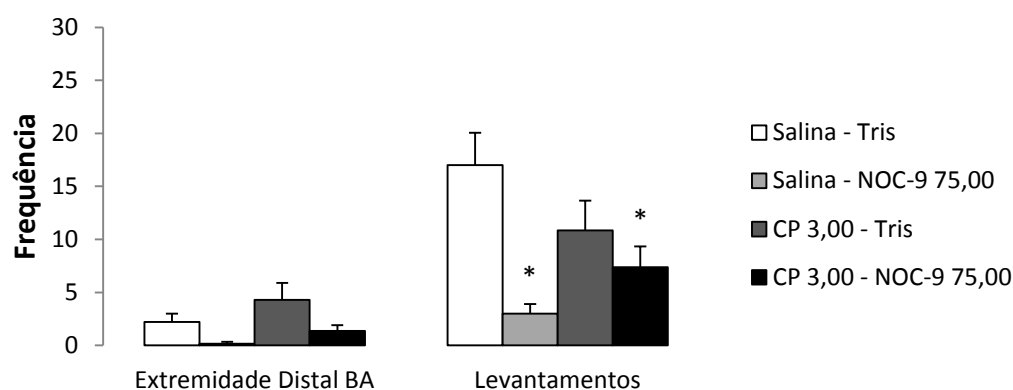


Figura 12: Efeitos da microinjeção combinada de CP 376395 (3,00 nmol/0,2  $\mu$ L) e NOC-9 (75,00 nmol/0,2  $\mu$ L) no BNST de camundongos sobre a frequência de entradas na extremidade dos braços abertos do LCE e de levantamentos. As colunas representam as médias ( $\pm$  EPM). N = 6-9 animais por grupo. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo salina-NOC-9.

## 4.5 EXPERIMENTO IV: EFEITOS DA MICROINJEÇÃO INTRA-BNST DE AP-7 SOBRE OS COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO LCE.

### 4.5.1 Efeitos do AP-7 intra-BNST sobre as medidas espaço-temporais de camundongos expostos ao LCE

A Figura 13 mostra os índices de ansiedade (porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos) avaliados em animais submetidos ao LCE após receberem injeção intra-BNST de AP-7 (0, 0,05, 0,10 ou 0,20 nmol). A ANOVA monofatorial seguida do teste de comparações múltiplas de Duncan revelou que a injeção de AP-7, apenas na dose de 0,20 nmol, alterou a porcentagem de entradas ( $F_{3,26} = 3,85$ ;  $p < 0,05$ ), bem como o tempo gasto ( $F_{3,26} = 6,54$ ;  $p < 0,05$ ) nos braços abertos do LCE em relação ao grupo controle (Salina). ANOVA não revelou diferenças significativas para a frequência de entradas nos braços fechados do aparato ( $F_{3,26} = 1,40$ ;  $p > 0,05$ ).

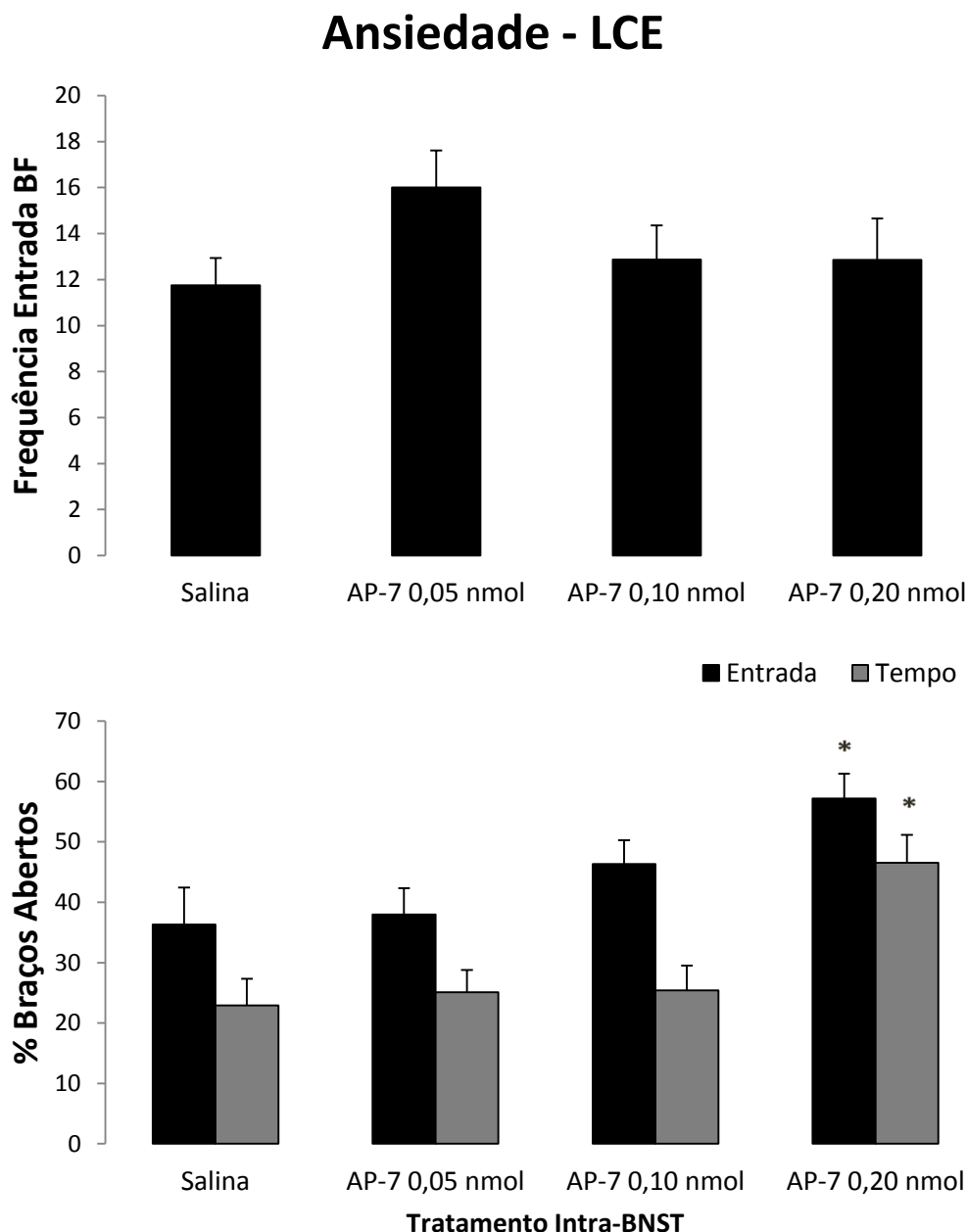


Figura 13: Efeitos da microinjeção de veículo ou AP-7 (0,05; 0,10 ou 0,20 nmol/0,2  $\mu$ l) no BNST de camundongos sobre a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos (inferior) e a frequência de entradas nos braços fechados (BF) do LCE (superior). As colunas representam as médias ( $\pm$  EPM). N = 7-8 animais por grupo.

#### 4.5.2 Efeitos do AP-7 intra-BNST sobre as medidas complementares de camundongos expostos ao LCE

A Figura 14 mostra os efeitos da injeção de AP-7 (0, 0,05, 0,10 ou 0,20 nmol) sobre as medidas complementares analisadas: HD desprotegido, HD protegido, SAP desprotegido, SAP protegido, frequência de entradas na extremidade dos braços abertos

e frequência de levantamentos. ANOVA unifatorial seguida do teste post hoc de Duncan indicou que a injeção de AP-7, apenas na dose de 0,02 nmol, apresentou diferenças significativas nos comportamentos de mergulho com a cabeça desprotegido ( $F_{3,26} = 9,90$ ;  $p < 0,05$ ], bem como na frequência de entradas na extremidade dos braços abertos (F3,26= 5,37;  $p < 0,05$ ] no LCE em relação ao grupo controle (Salina).

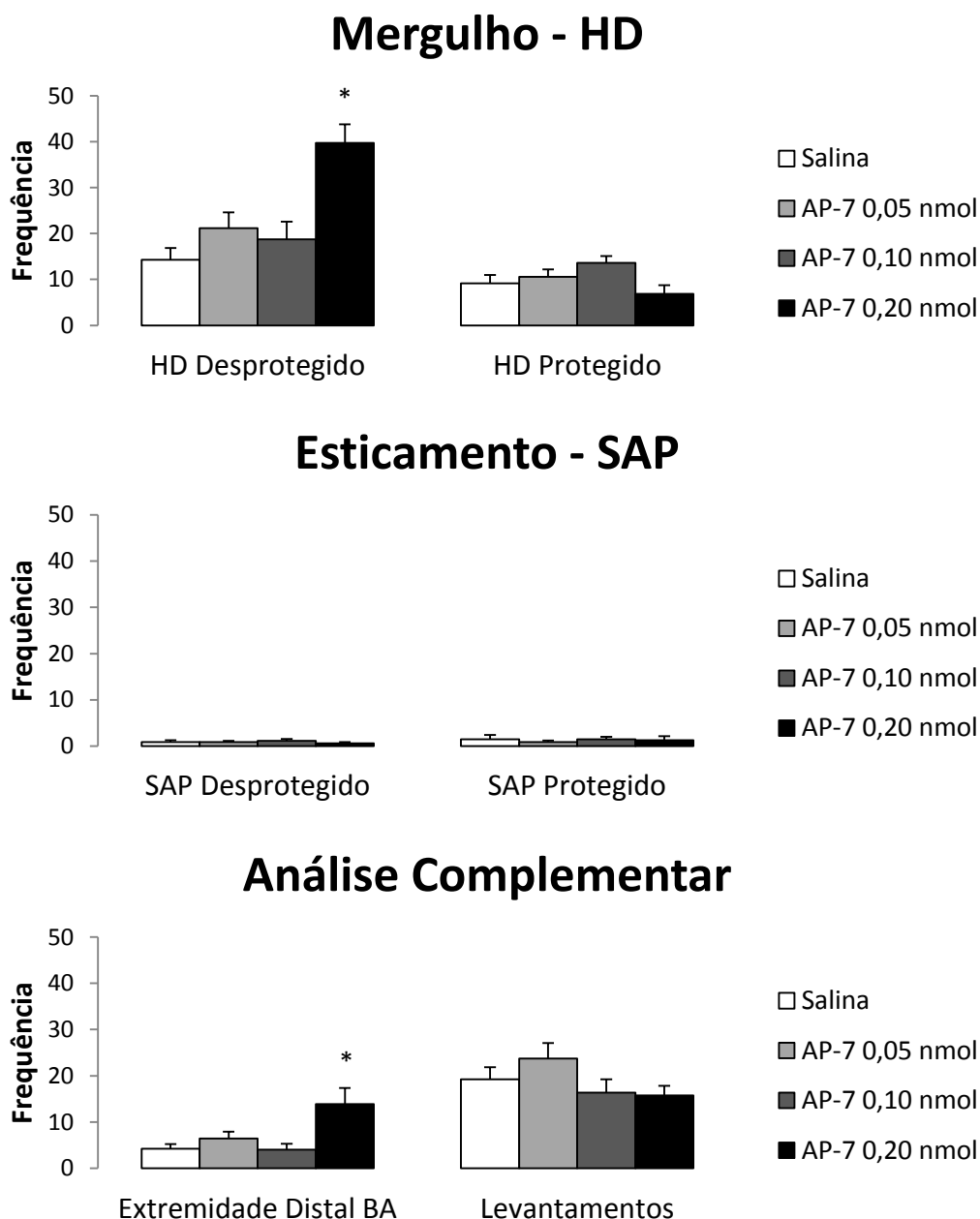


Figura 14: Efeitos da microinjeção de AP-7 (0, 0,05, 0,10 ou 0,20 nmol/0,2  $\mu$ L) no BNST de camundongos sobre o comportamento de mergulhar com a cabeça (HD), de esticar-se (SAP) bem como a frequência de entradas na extremidade dos braços abertos do LCE e de levantamentos. As colunas representam as médias ( $\pm$  EPM). N = 7-8 animais por grupo.

## 4.6 EXPERIMENTO V: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO BLOQUEIO DE RECEPTORES NMDA SOBRE OS EFEITOS AVERSIVOS DO NOC-9 NO BNST

### 4.6.1 Análise do tempo de exibição do comportamento de imobilidade

ANOVA bifatorial não revelou diferenças estatísticas no pré-tratamento ( $F_{1,32}= 0,004$ ;  $p > 0,05$ ), mas revelou no tratamento ( $F_{1,32}= 49,29$ ;  $p < 0,05$ ). Na interação entre os fatores não houve diferenças significativas ( $F_{1,32}= 0,004$ ;  $p > 0,05$ ). Comparações posteriores (teste de Duncan) revelaram que o NOC-9 promoveu a exibição do comportamento de imobilidade (grupo salina + NOC-9) e que a injeção prévia de AP-7 (0,05 nmol) não foi eficaz em atenuar este comportamento provocado pelo NOC-9 no BNST (grupo AP-7 + NOC-9; Figura 15).

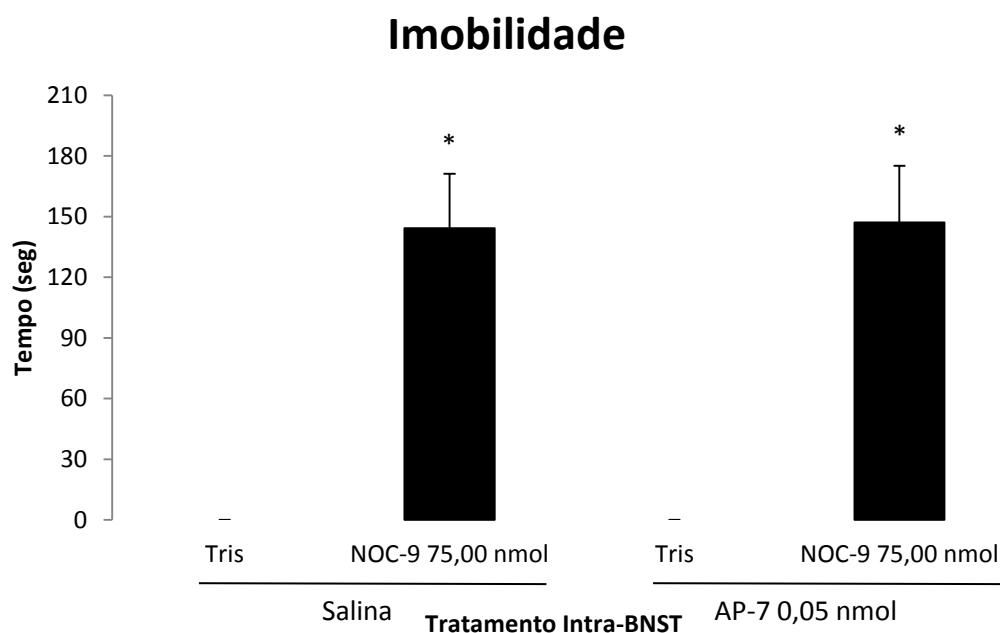


Figura 15: Efeitos das microinjeções combinadas de AP-7 (0,05 nmol/0,2  $\mu$ L) e NOC-9 (75,00 nmol/0,2  $\mu$ L) no BNST de camundongos sobre tempo em segundos de exibição do comportamento de imobilidade. As colunas representam as médias ( $\pm$  EPM). N = 7-10 animais por grupo. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo salina-tris.

### 4.6.2 Avaliação dos efeitos da microinjeção combinada de AP-7 e NOC-9 no BNST sobre as medidas espaço-temporais no LCE

A Figura 16 mostra as análises espaço-temporais (frequência de entradas nos braços fechados e a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos) avaliados

em animais submetidos ao LCE após receberem injeção prévia intra-BNST de AP-7 (0,05 nmol) seguido (10 minutos após) de injeção intra-BNST de NOC-9 (75,00 nmol). ANOVA bifatorial da frequência de entradas nos braços fechados não revelou diferenças estatísticas no pré-tratamento ( $F_{1,32} = 0,01$ ;  $p > 0,05$ ), mas revelou no tratamento ( $F_{1,32} = 6,24$ ;  $p < 0,05$ ). Na interação entre os fatores, não houve diferença significativa ( $F_{1,32} = 0,05$ ;  $p > 0,05$ ). Comparações posteriores (teste de Duncan) revelaram que a injeção combinada não alterou a frequência de entradas entre os grupos e o controle Salina + Tris. ANOVA bifatorial da porcentagem de entrada nos braços abertos revelou diferenças estatísticas no pré-tratamento ( $F_{1,32} = 4,83$ ;  $p < 0,05$ ), mas não no tratamento ( $F_{1,32} = 1,78$ ;  $p > 0,05$ ). Na interação entre os fatores houve diferenças estatísticas ( $F_{1,32} = 4,76$ ;  $p < 0,05$ ). Comparações posteriores (teste de Duncan) revelaram que a injeção combinada de Salina + NOC-9 foi significativamente diferente do grupo controle Salina + NOC-9. Mostrou também que a porcentagem de entradas, nesses braços, do grupo AP-7 + NOC-9 foi significativamente diferente do grupo Salina + NOC-9. O efeito do NOC-9 75,00 nmol foi revertido pela injeção prévia de AP-7 0,05 nmol. Com relação ao tempo de permanência nos braços abertos a ANOVA bifatorial não revelou diferenças estatísticas no pré-tratamento ( $F_{1,32} = 1,13$ ;  $p > 0,05$ ), mas revelou no tratamento ( $F_{1,32} = 4,90$ ;  $p < 0,05$ ) bem como na interação entre os fatores ( $F_{1,32} = 6,71$ ;  $p < 0,05$ ). Comparações posteriores (teste de Duncan) revelaram que a injeção combinada, alterou a porcentagem de tempo de permanência do grupo Salina + NOC-9 em relação ao grupo controle Salina + Tris. Mostrou também que a porcentagem de tempo de permanência, nesses braços, do grupo AP-7 + NOC-9 foi significativamente diferente do grupo Salina + NOC-9. O efeito do NOC-9 75,00 nmol foi revertido pela injeção prévia de AP-7 0,05 nmol.

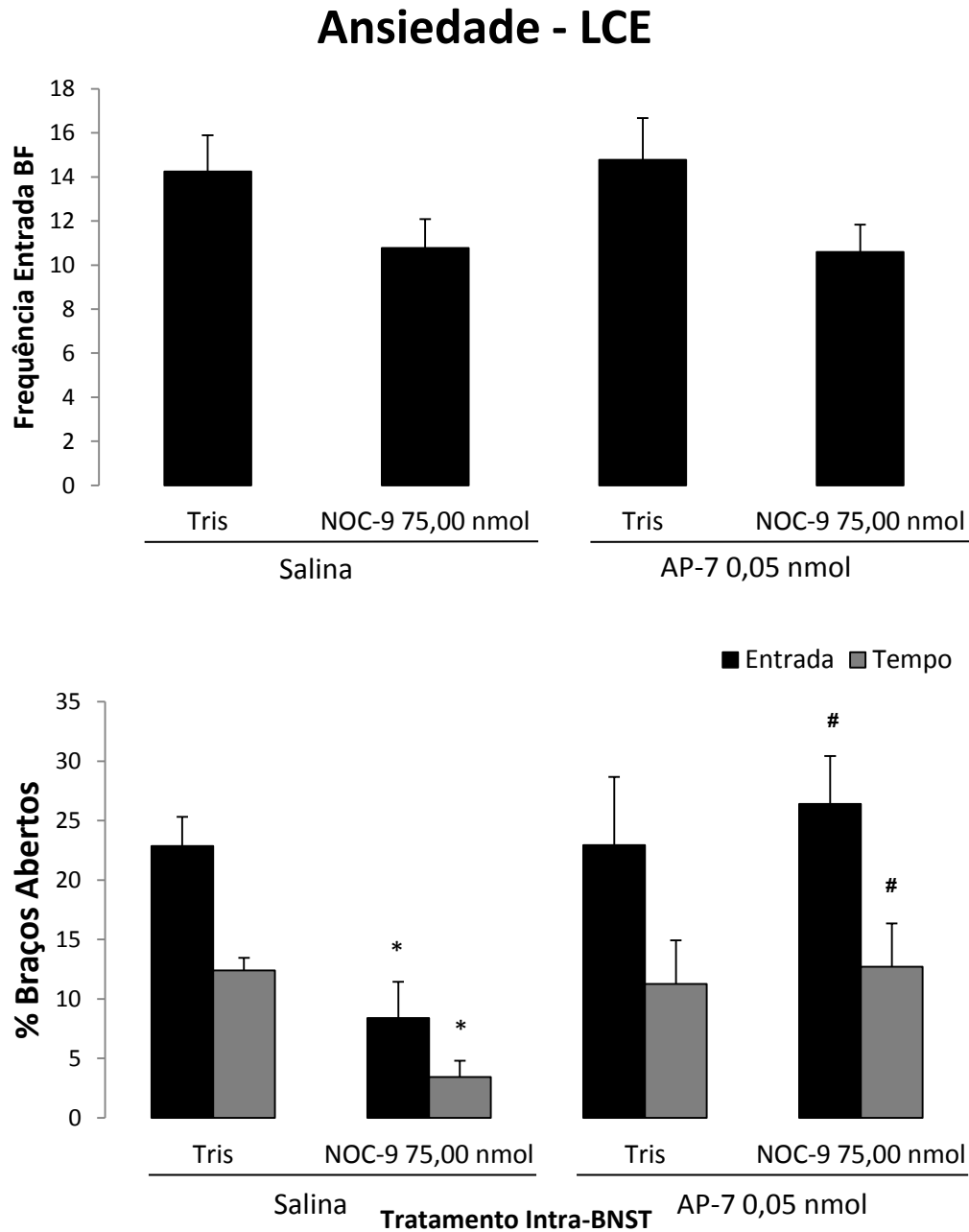


Figura 16: Efeitos da microinjeção combinada de AP-7 (0,05 nmol/0,2  $\mu$ L) e NOC-9 (75,0 nmol/0,2  $\mu$ L) no BNST de camundongos sobre a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos (inferior) e a frequência de entradas nos braços fechados (EBF) do LCE (superior). As colunas representam as médias ( $\pm$  EPM). N = 7-10 animais por grupo. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo salina-tris e # $p < 0,05$  comparado ao grupo salina-NOC-9.

#### 4.6.3 Avaliação dos efeitos da microinjeção combinada de AP-7 e NOC-9 no BNST sobre as medidas complementares no LCE

As Figuras 17, 18 e 19 mostram os efeitos da injeção combinada de AP-7 (0,05 nmol) e NOC-9 (75,00 nmol) sobre as medidas complementares analisadas: HD desprotegido, HD protegido, SAP desprotegido, SAP protegido, frequência de entradas na extremidade dos braços abertos e frequência de levantamentos. ANOVA bifatorial não indicou efeito significativo no pré-tratamento ( $F_{1,32} = 2,54$ ;  $p > 0,05$ ), no tratamento ( $F_{1,32} = 1,01$ ;  $p > 0,05$ ), bem como na interação entre os fatores ( $F_{1,32} = 1,24$ ;  $p > 0,05$ ) para o comportamento de mergulhar com a cabeça nos braços abertos do LCE (área desprotegida, HD desprotegido; Figura 17). Com relação ao HD nas áreas protegidas (HD protegido), houve diferenças significativas no pré-tratamento ( $F_{1,32} = 5,27$ ;  $p < 0,05$ ), mas não no tratamento ( $F_{1,32} = 2,75$ ;  $p > 0,05$ ) bem como na interação entre os fatores ( $F_{1,32} = 1,04$ ;  $p > 0,05$ ; Figura 17). Análise post hoc (teste de Duncan) revelou um efeito isolado, onde houve um aumento da exibição deste comportamento do grupo AP-7 + Tris em relação ao grupo controle Salina + Tris,  $p < 0,05$ .

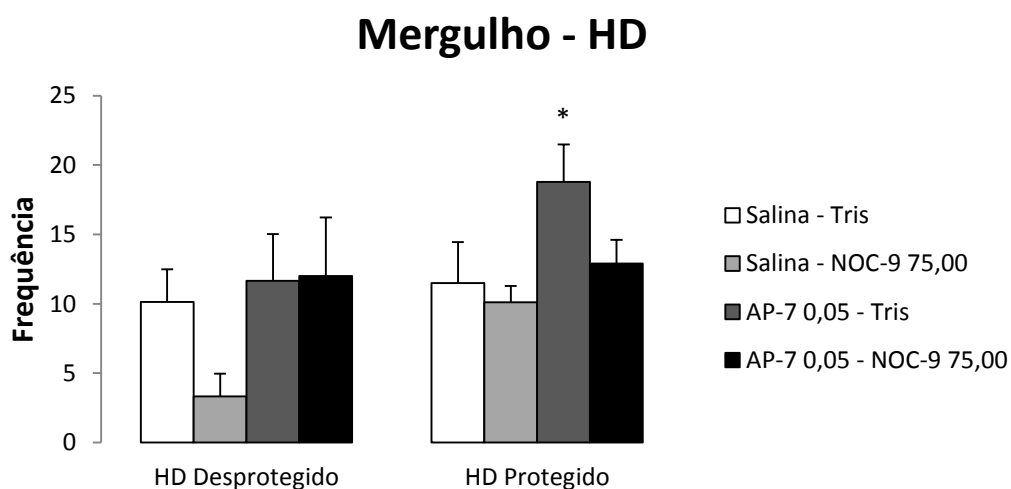


Figura 17: Efeitos da microinjeção combinada de AP-7 (0,05 nmol/0,2  $\mu$ L) e NOC-9 (75,00 nmol/0,2  $\mu$ L) no BNST de camundongos sobre o comportamento de mergulhar com a cabeça (HD). As colunas representam as médias ( $\pm$  EPM). N = 7-10 animais por grupo. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo salina-tris.

ANOVA bifatorial não indicou efeito significativo no pré-tratamento ( $F_{1,32} = 1,19$ ;  $p > 0,05$ ), mas revelou no tratamento ( $F_{1,32} = 8,07$ ;  $p < 0,05$ ), bem como na interação entre os fatores ( $F_{1,32} = 3,36$ ;  $p < 0,05$ ) para o comportamento de esticar-se nos braços abertos do LCE (área desprotegida, SAP desprotegido; figura 18). Análises post hoc de Duncan indicaram que a injeção combinada de AP-7 e NOC-9, nos grupos Salina +



NOC-9, AP-7 + Tris e AP-7 + NOC-9, reduziu o comportamento de esticar-se (SAP) nos braços abertos do LCE ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle Salina + Tris. O efeito do NOC-9 75,00 nmol não foi revertido pela injeção prévia de AP-7 0,05 nmol. Com relação ao SAP nas áreas protegidas (SAP protegido), ANOVA bifatorial não revelou diferenças significativas no pré-tratamento ( $F_{1,32} = 0,08$ ;  $p > 0,05$ ) no tratamento ( $F_{1,32} = 2,50$ ;  $p > 0,05$ ) bem como na interação entre os fatores ( $F_{1,32} = 0,74$ ;  $p > 0,05$ ; Figura 18). Análises post hoc de Duncan indicaram que a injeção combinada, não alterou o comportamento dos grupos tratados em relação ao grupo controle Salina + Tris.

### Esticamento - SAP

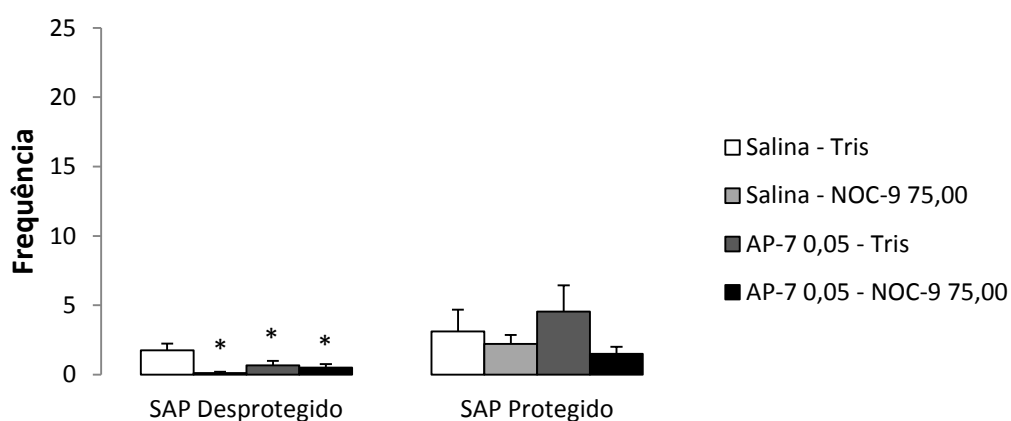


Figura 18: Efeitos da microinjeção combinada de AP-7 (0,05 nmol/0,2  $\mu$ L) e NOC-9 (75,00 nmol/0,2  $\mu$ L) no BNST de camundongos sobre o comportamento de esticar-se (SAP). As colunas representam as médias ( $\pm$  EPM). N = 7-10 animais por grupo. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo salina-NOC-9.

A Figura 19 mostra os comportamentos de frequência de entradas na extremidade dos braços abertos e de levantamentos. Com respeito à primeira variável, ANOVA bifatorial não indicou efeitos significativo no pré-tratamento ( $F_{1,32} = 0,47$ ;  $p > 0,05$ ), no tratamento ( $F_{1,32} = 1,17$ ;  $p > 0,05$ ), assim como na interação entre os grupos ( $F_{1,32} = 1,95$ ;  $p > 0,05$ ) para o comportamento de frequência de entradas na extremidade final dos braços abertos (figura 19). Análises post hoc de Duncan indicaram que a injeção combinada, não alterou o comportamento dos grupos tratados em relação ao grupo controle Salina + Tris. Com relação ao levantamento, não houve diferenças significativas no pré-tratamento ( $F_{1,32} = 1,04$ ;  $p > 0,05$ ) no tratamento ( $F_{1,32} = 3,65$ ;  $p > 0,05$ ), bem como na interação entre os fatores ( $F_{1,32} = 0,14$ ;  $p > 0,05$ ; Figura 19). Análises

post hoc de Duncan indicaram que a injeção combinada, não alterou o comportamento dos grupos tratados em relação ao grupo controle Salina + Tris.

## Análise Complementar

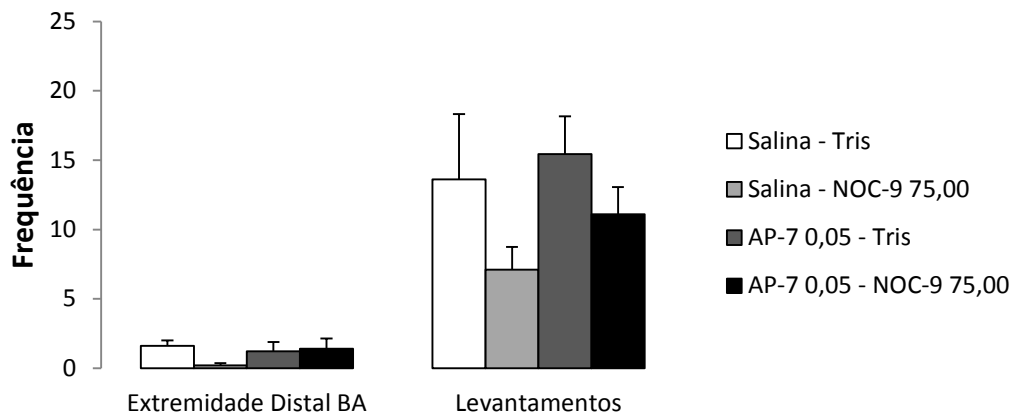


Figura 19: Efeitos da microinjeção combinada de AP-7 (0,05 nmol/0,2  $\mu$ L) e NOC-9 (75,00 nmol/0,2  $\mu$ L) no BNST de camundongos sobre a frequência de entradas na extremidade dos braços abertos do LCE e de levantamentos. As colunas representam as médias ( $\pm$  EPM). N = 7-10 animais por grupo.

## 5. DISCUSSÃO

Em suma, os resultados obtidos mostram que o bloqueio de receptores CRF1 no BNST não altera o comportamento defensivo de camundongos expostos ao LCE. Ainda, a facilitação da transmissão nitrérgica nesta estrutura resultou em imobilidade, bem como aumento da ansiedade no LCE. Enquanto o efeito ansiogênico do NOC-9 no BNST foi atenuado pela injeção prévia do antagonista CRF1 CP376395, a imobilidade não foi alterada. Um perfil farmacológico semelhante foi observado quando o antagonista de receptores NMDA AP-7, numa dose sem efeito *per se*, foi administrado previamente ao doador de óxido nítrico no BNST – a imobilidade permaneceu inalterada, enquanto a ansiogênese no LCE foi completamente bloqueada. Em contraste com a ausência de efeitos *per se* observada com a injeção de CP376395, a maior dose de AP-7 produziu efeitos ansiolíticos quando injetada no BNST.

No presente estudos foi observado que a microinjeção intra-BNST de NOC-9, nas doses 18,75, 37,50 e 75,00 nmol, produziu efeitos ansiogênicos, evidenciados pela exibição do comportamento de imobilidade e diminuição do tempo de exploração dos braços abertos do LCE, bem como algumas alterações na exibição de comportamentos de avaliação de risco. De modo interessante, cabe ressaltar que o mesmo fármaco em doses semelhantes àquelas utilizadas neste estudo, quando microinjetado em outra estrutura envolvida na mediação de respostas defensivas, a matéria cinzenta periaquedutal (MCP), provocou reações comportamentais explosivas, caracterizadas por saltos e corridas, além de imobilidade (Miguel *et al.*, 2012). Além disso, resultados recentes (não publicados) de nosso laboratório demonstraram que a microinjeção de NOC-9 no córtex pré-frontal medial direito (CPFmd), uma estrutura prosencefálica também envolvida no controle de estados emocionais aversivos, não provocou respostas comportamentais explosivas ou imobilidade, no entanto, produziu efeitos ansiogênicos. Tomados em conjunto, estes resultados demonstram que a excitação provocada pela liberação de NO, através do seu doador, induz diferentes respostas, embora todas indiquem aumento da ansiedade e/ou aversão, evidenciando diferentes tipos de mediações nos diferentes tipos de respostas de defesa exercida pelos sítios encefálicos.

Neste sentido, Mcnaughton e Corr (2004) propuseram uma hierarquia encefálica no controle dos comportamentos defensivos, na qual a ativação de estruturas mais caudais como a MCP estaria envolvida com o estado de medo (perigo real) com

exibição de respostas explosivas e reações de fuga e luta. Resultados do nosso grupo corroboram essa hipótese onde a injeção do NOC-9 nesta estrutura mesencefálica produz reações de defesa intempestivas (Miguel *et al.*, 2012). Por outro lado, estruturas prosencefálicas mais rostrais, como o córtex pré-frontal medial, estariam relacionadas com a mediação da ansiedade (perigo potencial) com exibição de respostas mais refinadas e elaboradas, como os comportamentos de avaliação de risco. De acordo com essa categorização das estruturas, o BNST figuraria com um papel hierárquico intermediário, uma vez que não foram observadas respostas comportamentais explosivas como na MCP. Contudo, conforme demonstrado no começo deste estudo, a facilitação nitrérgica do BNST, através do doador de NO, produziu não somente aumento dos índices de ansiedade e avaliação de risco em camundongos expostos ao LCE, mas também imobilidade.

Resultados da literatura demonstraram que a inativação farmacológica do BNST diminui a expressão de respostas condicionadas ou incondicionadas a estímulos aversivos (Sahuque *et al.*, 2006). Além disso, Dunn (1987) e Casada e Dafny (1991) demonstraram que a estimulação elétrica do BNST em ratos promoveu alterações comportamentais e endócrinas similares às aquelas evocadas pelo estresse. Esses resultados são corroborados pelo presente estudo, denotando a função desta estrutura também nas respostas inatas.

Os resultados obtidos com o NOC-9 neste estudo são importantes na tentativa de melhor entender os mecanismos que medeiam à neurobiologia dos transtornos de ansiedade. Este doador de NO é também uma ferramenta para se identificar outros mensageiros recrutados pela ativação das cascatas intracelulares em decorrência de situações aversivas. Dentre eles, destaca-se a participação do GMP cíclico e da interação do NO com neurotransmissores excitatórios, como glutamato e CRF, e inibitório, como o GABA (Garthwaite *et al.*, 1989; Schmidt *et al.*, 1993; Contestabile, 2000; Prast e Philippu, 2001; Rivier, 2001; Esplugues, 2002; Cossenza *et al.*, 2014). Sabe-se que o efeito do NO sobre o GABA é bifásico, dependendo da sua concentração. Em níveis basais o NO induz uma depleção na liberação do GABA e em altas concentrações o NO aumenta a liberação de GABA (Getting *et al.*, 1996).

Baseando-se nesta premissa e nos efeitos ansiogênicos do NOC-9, foi investigado o papel dos receptores de CRF, um neurotransmissor intimamente relacionado com respostas ao estresse, nas respostas provocadas pela estimulação produzida pela facilitação da transmissão nitrérgica no BNST. Como resultado, foi

observado que a aversão induzida pelo NOC-9 no BNST parece ter sido decorrente da ativação de diferentes mecanismos, sendo um deles dependente do CRF. Em outras palavras, o tratamento prévio com CP 376395, um antagonista CRF1, foi eficaz em bloquear o efeito ansiogênico do NOC-9 no LCE, porém sem alterar sua propriedade de induzir o comportamento de imobilidade. Estes resultados são sugestivos de que o NOC-9 pode ter levado a liberação de outros neurotransmissores responsáveis pela mediação da resposta de imobilidade. Em apoio a esta hipótese existem evidências mostrando que o NO facilita a liberação de neurotransmissores como o glutamato, dopamina, serotonina, acetilcolina e GABA (Guevara-Guzman *et al.*, 1994; Guix *et al.*, 2005; Cossenza *et al.*, 2014), os quais não estariam impedidos de agir, pelo menos por um processo competitivo, com a injeção prévia com CP 376395. Contudo, faz-se também necessário investigar se tais neurotransmissores, de fato, provocam imobilidade quando liberados no BNST. Esse fato indica uma modulação diferencial do CRF no efeito do NO. Assim, o NO parece recrutar o CRF para um determinado padrão de reações de defesa relacionadas com respostas mais sutis, como as observadas no LCE, porém não para aquelas mais intensas, como a imobilidade.

A ausência de efeitos do bloqueio CRF1 sobre a imobilidade induzida pelo NOC-9 no BNST não corrobora integralmente estudos prévios, embora conduzidos em uma estrutura encefálica diferente. O antagonista de CRF, NBI 27914 preveniu o efeito do NOC-9 na MCP, região na qual a intensificação da via nitrérgica provocou respostas intempestivas, além de imobilidade (Miguel *et al.*, 2012). Entretanto, estudos anteriores mostraram que a estimulação CRFérgica na matéria cinzenta periaquedutal não provocava respostas intempestivas como saltos e corridas, mas sim um intenso efeito ansiogênico no LCE (Miguel e Nunes-De-Souza, 2011). Esses resultados mostram mais uma vez a facilitação da transmissão CRFérgica produzindo reações de defesa sutis.

Além disso, Schenberg *et al.* (2008) demonstraram que a estimulação elétrica da MCP, um modelo conhecido de indução de aversão, não provoca ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), evidenciado pela inalteração dos níveis de corticosterona plasmática em ratos (Schenberg *et al.*, 2008). Este estudo parece corroborar nossos resultados, uma vez que, embora em áreas diferentes, o comportamento de imobilidade provocado pela injeção de NOC-9, aparentemente mais aversivo e responsivo a ameaças mais proximais e inescapáveis que o braço aberto do LCE, do qual o animal pode se esquivar (uma vez que não foi confinado), não foi alterado pela prévia injeção do antagonista de CRF. Isto indica que, pelo menos num

primeiro momento, a injeção de NOC-9 parece não promover liberação maciça de CRF. Entretanto, a injeção de NOC-9 associada à exposição do animal ao LCE, parece induzir a liberação deste peptídeo, uma vez que seu antagonismo, mesmo em doses isentas de efeito *per se*, foi eficaz em bloquear o efeito ansiogênico do NO.

O presente trabalho está em acordo com outros estudos anteriores como o de Raber *et al.* (1995), os quais demonstraram haver liberação de CRF após administração de nitroprussiato, outro doador de NO, em diferentes sítios como amígdala e hipotálamo, estruturas também pertencentes ao sistema límbico. Neste sentido, foi demonstrado ainda que a liberação de CRF produzida por interleucina e acetilcolina pode ser mediada por NO, uma vez que a inibição de sua enzima de síntese pelo L-NAME reverteu tal efeito (Karanth *et al.*, 1993). Ainda, Lee *et al.* (1999) demonstraram que a injeção intracerebroventricular de SIN-1, outro composto doador de NO, elevou os níveis de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e induziu aumento na transcrição gênica para o CRF, elevando também os níveis de RNA mensageiro para receptor CRF1 e para o NGFI-B. Este último trata-se de um gene de expressão imediata, indicador do aumento da atividade neuronal. Este fator estimula a transcrição gênica através de elementos responsivos ao NGFI-B, compartilhando sequências-consenso na região promotora com o gene indutor da produção de CRF e esteroides (Wilson *et al.*, 1991; Chan *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1999). Em outras palavras, o NGFI-B é utilizado como um marcador de atividade de neurônios envolvidos com o CRF. Com base nesses estudos, é plausível sugerir que a liberação de CRF pode ser induzida pelo NO em diferentes sítios encefálicos, incluindo-se aqui o BNST.

Tomados em conjunto, esses estudos sugerem a participação do CRF no mecanismo de ação do NO, pelo menos nas respostas no LCE. Entretanto, essa possível diferenciação na modulação do CRF no efeito do NO é um fenômeno que necessita ser mais investigado. Os resultados obtidos no presente estudo apontam para uma nova linha de possibilidades experimentais, permitido sugerir que, pelo menos no BNST, o NO sofre modulação diferencial do CRF, que estaria mais envolvido na modulação de respostas de ansiedade mais sutis, tais como aquelas obtidas no LCE, porém não naquelas associadas às respostas de medo e pânico, evidenciadas pela expressão da imobilidade.

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC, regulando muitos aspectos da função cerebral. Essa função depende da ativação de seus receptores metabotrópicos (mGlu) e/ou ionotrópicos (NMDA, AMPA e Kainato) (Danbolt, 2001).

Diversos estudos têm sugerido que o NO promove liberação de glutamato no SNC de ratos, incluindo o hipocampo (Segieth *et al.*, 1995), bulbo dorsomedial (Lawrence e Jarrott, 1993) e corpo estriado (Guevara-Guzman *et al.*, 1994). Com relação à interação NO e NMDA, estudos mostraram que o bloqueio de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e da enzima NOS bloquearam a liberação de glutamato induzida por ativação de receptores NMDA em diversas estruturas, como o hipocampo, núcleo do trato solitário, córtex cerebral e corpo estriado (Segieth *et al.*, 1995; Kano *et al.*, 1998; Segovia e Mora, 1998; Matsuo *et al.*, 2001), mostrando que a liberação de glutamato induzida por ativação de receptores NMDA pode ser mediada pelo NO. Neitz *et al.* (2014) mostraram que há uma interferência direta da transmissão nitrérgica nos receptores glutamatérgicos. Ainda, a relação entre NMDA e NO tem sido bastante explorada na investigação da neurobiologia do medo condicionado em ratos (e.g, hipocampo dorsal e PAG dorsolateral) (Aguiar *et al.*, 2014; Fabri *et al.*, 2014).

Nesse sentido, estudos anteriores mostraram que o bloqueio de receptores de glutamato do tipo NMDA com AP-7, microinjetado na matéria cinzenta periaquedutal de ratos, produziu um efeito ansiolítico dose dependente, com aumento de entradas nos braços abertos do LCE (Guimaraes *et al.*, 1991). Nesse sentido, um estudo do nosso laboratório mostrou que o bloqueio de receptores de glutamato NMDA com o mesmo fármaco na MCPd de camundongos, atenuou a aversão eliciada pela exposição ao LCE (Nunes-De-Souza *et al.*, 2010). Sendo o BNST uma região altamente povoada por neurônios glutamatérgicos (Mcelligott e Winder, 2008), tornou-se relevante investigar o envolvimento desses neurônios com o NO. No presente estudo (experimento IV), foi demonstrado que a injeção intra-BNST de AP-7 em camundongos provocou um efeito ansiolítico dose dependente no LCE. De maneira importante, esse efeito foi desprovido de quaisquer alterações na locomoção dos animais no LCE. A injeção prévia de AP-7 numa dose desprovida de efeito per se foi capaz de bloquear os efeitos ansiogênicos eliciados pela facilitação da transmissão nitrérgica no BNST de camundongos expostos ao LCE (experimento V). Da mesma forma que os resultados obtidos com o antagonista de receptores CRF1 CP376395, o AP-7 não foi capaz de bloquear a imobilidade resultante da injeção de NOC-9 no BNST. Embora não estudados nesse trabalho, outros receptores glutamatérgicos podem também estar envolvidos na modulação das reações de defesa no BNST.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo indicam existir uma relação entre a neurotransmissão nitrérgica, CRFérgica e glutamatérgica, de tal forma que o óxido nítrico parece recrutá-las. Ainda, os mecanismos farmacológicos envolvidos na modulação das diferentes reações de defesa eliciadas pela facilitação da transmissão nitrérgica no BNST de camundongos parece ser dissociada, uma vez que a ansiogênese eliciada pelo NO no LCE, com diminuição da entrada e tempo gasto nos braços abertos, foi revertida pelo bloqueio dos receptores CRF1 e NMDA, porém, a imobilidade, outro comportamento ansiogênico produzido pelo NO, não foi afetada pelo bloqueio dos mesmos receptores. Estudos adicionais para a investigação da participação de outros neurotransmissores e receptores no efeito pró-aversivo induzido pelo óxido nítrico no BNST se fazem necessários.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, D. C. et al. The dorsolateral periaqueductal grey N-methyl-D-aspartate/nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway modulates the expression of contextual fear conditioning in rats. **J Psychopharmacol**, v. 28, n. 5, p. 479-85, May 2014. ISSN 1461-7285 (Electronic)

0269-8811 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24008812> >.

ALHEID, G. F. Extended amygdala and basal forebrain. **Ann N Y Acad Sci**, v. 985, p. 185-205, Apr 2003. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12724159> >.

BALE, T. L. et al. Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. **Nat Genet**, v. 24, n. 4, p. 410-4, Apr 2000. ISSN 1061-4036 (Print)

1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10742108> >.

BANDLER, R. Brain mechanisms of aggression as revealed by electrical and chemical stimulation, suggestion of a central role for the midbrain periaqueductal gray region. In: EPSTEIN, A. e HARRISON, A. (Ed.). **Progress in Psychobiology and Physiological Psychology**. New York: New York Academic Press, v.13, 1988. p.67-74.

BANDLER, R.; CARRIVE, P. Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. **Brain Res**, v. 439, n. 1-2, p. 95-106, Jan 26 1988. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3359200> >.

BANDLER, R.; DEPAULIS, A. A. Midbrain periaqueductal gray control of defensive behavior in the cat and rat. In: DEPAULIS, A. A. e BANDLER, R. (Ed.). **The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization**. New York: Plenum Press, 1991. p.175-98.

BARAM, T. Z. et al. The CRF1 receptor mediates the excitatory actions of corticotropin releasing factor (CRF) in the developing rat brain: in vivo evidence using a novel, selective, non-peptide CRF receptor antagonist. **Brain Res**, v. 770, n. 1-2, p. 89-95, Oct 3 1997. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9372207> >.

BEHBEHANI, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Prog Neurobiol**, v. 46, n. 6, p. 575-605, Aug 1995. ISSN 0301-0082 (Print)

0301-0082 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8545545> >.

BEIJAMINI, V.; GUIMARAES, F. S. c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat. **Behav Brain Res**, v. 170, n. 1, p. 52-61, Jun 3 2006. ISSN 0166-4328 (Print)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16546272> >.

BERRIDGE, C. W.; DUNN, A. J. CRF and restraint-stress decrease exploratory behavior in hypophysectomized mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 34, n. 3, p. 517-9, Nov 1989. ISSN 0091-3057 (Print)

0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2623010> >.

BLANCHARD, D. C. et al. Human defensive behaviors to threat scenarios show parallels to fear- and anxiety-related defense patterns of non-human mammals. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, n. 7-8, p. 761-70, Dec 2001. ISSN 0149-7634 (Print)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11801300> >.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Bringing natural behaviors into the laboratory: a tribute to Paul MacLean. **Physiol Behav**, v. 79, n. 3, p. 515-24, Aug 2003. ISSN 0031-9384 (Print)

0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12954446> >.

BLANCHARD, R. J. et al. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behav Brain Res**, v. 58, n. 1-2, p. 155-65, Dec 20 1993. ISSN 0166-4328 (Print)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7907880> >.

BOWERS, L. K.; SWISHER, C. B.; BEHBEHANI, M. M. Membrane and synaptic effects of corticotropin-releasing factor on periaqueductal gray neurons of the rat. **Brain Res**, v. 981, n. 1-2, p. 52-7, Aug 15 2003. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12885425> >.

BRANDAO, M. L. et al. [Neural organization of different types of fear: implications for the understanding of anxiety]. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 25 Suppl 2, p. 36-41, Dec 2003. ISSN 1809-452X (Electronic)

1516-4446 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14978585> >.

BRITTON, D. R. et al. Dexamethasone suppresses pituitary-adrenal but not behavioral effects of centrally administered CRF. **Life Sci**, v. 38, n. 3, p. 211-6, Jan 20 1986. ISSN 0024-3205 (Print)

0024-3205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3001465> >.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 8, p. 1193-205, 2005. ISSN 0149-7634 (Print)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16084592> >.

CARRIVE, P. et al. Conditioned fear to context is associated with increased Fos expression in the caudal ventrolateral region of the midbrain periaqueductal gray. **Neuroscience**, v. 78, n. 1, p. 165-77, May 1997. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9135098> >.

CASADA, J. H.; DAFNY, N. Restraint and stimulation of bed nucleus of the stria terminalis produce similar stress-like behaviors. **Brain Res Bull**, v. 27, n. 2, p. 207-12, Aug 1991. ISSN 0361-9230 (Print)

0361-9230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1742609> >.

CHAN, R. K. et al. A comparison of two immediate-early genes, c-fos and NGFI-B, as markers for functional activation in stress-related neuroendocrine circuitry. **J Neurosci**, v. 13, n. 12, p. 5126-38, Dec 1993. ISSN 0270-6474 (Print)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8254363> >.

CHANG, C. P. et al. Identification of a seven transmembrane helix receptor for corticotropin-releasing factor and sauvagine in mammalian brain. **Neuron**, v. 11, n. 6, p. 1187-95, Dec 1993. ISSN 0896-6273 (Print)

0896-6273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8274282> >.

CHARBONNEAU, H. et al. Identification of a noncatalytic cGMP-binding domain conserved in both the cGMP-stimulated and photoreceptor cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 1, p. 288-92, Jan 1990. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2153290> >.

CHEN, R. et al. Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 19, p. 8967-71, Oct 1 1993. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7692441> >.

CONTESTABILE, A. Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 32, n. 2-3, p. 476-509, Apr 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10760552> >.

COSENZA, M. et al. Nitric oxide in the nervous system: biochemical, developmental, and neurobiological aspects. **Vitam Horm**, v. 96, p. 79-125, 2014. ISSN 0083-6729 (Print)

0083-6729 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25189385> >.

CUMMINGS, S. et al. Corticotropin-releasing factor immunoreactivity is widely distributed within the central nervous system of the rat: an immunohistochemical study. **J Neurosci**, v. 3, n. 7, p. 1355-68, Jul 1983. ISSN 0270-6474 (Print)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6345725> >.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Prog Neurobiol**, v. 65, n. 1, p. 1-105, Sep 2001. ISSN 0301-0082 (Print)

0301-0082 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11369436> >.

DAVIS, M. Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety? **Biol Psychiatry**, v. 44, n. 12, p. 1239-47, Dec 15 1998. ISSN 0006-3223 (Print)

0006-3223 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9861467> >.

DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Nitric oxide actions in neurochemistry. **Neurochem Int**, v. 29, n. 2, p. 97-110, Aug 1996a. ISSN 0197-0186 (Print)

0197-0186 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8837037> >.

\_\_\_\_\_. Nitric oxide neurotoxicity. **J Chem Neuroanat**, v. 10, n. 3-4, p. 179-90, Jun 1996b. ISSN 0891-0618 (Print)

0891-0618 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8811421> >.

DE OLIVEIRA, C. L.; DEL BEL, E. A.; GUIMARAES, F. S. Effects of L-NOARG on plus-maze performance in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 56, n. 1, p. 55-9, Jan 1997. ISSN 0091-3057 (Print)

0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8981609> >.

DE OLIVEIRA, R. M.; DEL BEL, E. A.; GUIMARAES, F. S. Effects of excitatory amino acids and nitric oxide on flight behavior elicited from the dorsolateral periaqueductal gray. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, n. 7-8, p. 679-85, Dec 2001. ISSN 0149-7634 (Print)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11801293> >.

DE OLIVEIRA, R. W.; DEL BEL, E. A.; GUIMARAES, F. S. Behavioral and c-fos expression changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. **Brain Res Bull**, v. 51, n. 6, p. 457-64, Apr 2000. ISSN 0361-9230 (Print)

0361-9230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10758334> >.

DUNN, J. D. Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. **Brain Res**, v. 407, n. 2, p. 327-31, Mar 31 1987. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3567648> >.

ESPLUGUES, J. V. NO as a signalling molecule in the nervous system. **Br J Pharmacol**, v. 135, n. 5, p. 1079-95, Mar 2002. ISSN 0007-1188 (Print)

0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11877313> >.

FABRI, D. R. et al. The expression of contextual fear conditioning involves activation of a NMDA receptor-nitric oxide-cGMP pathway in the dorsal hippocampus of rats. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 24, n. 10, p. 1676-86, Oct 2014. ISSN 1873-7862 (Electronic)

0924-977X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25174523> >.

FANSELOW, M. S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: DEPAULIS, A. A. e BANDLER, R. (Ed.). **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter**. New York: Plenum Press, 1991. p.151-73.

FARIA, M. S. et al. Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus maze test. **Eur J Pharmacol**, v. 323, n. 1, p. 37-43, Mar 26 1997. ISSN 0014-2999 (Print)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9105874> >.

FERREIRA-NETTO, C.; BORELLI, K. G.; BRANDAO, M. L. Neural segregation of Fos-protein distribution in the brain following freezing and escape behaviors induced by injections of either glutamate or NMDA into the dorsal periaqueductal gray of rats. **Brain Res**, v. 1031, n. 2, p. 151-63, Jan 21 2005. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15649440> >.

FOGACA, M. V. et al. Fine-tuning of defensive behaviors in the dorsal periaqueductal gray by atypical neurotransmitters. **Braz J Med Biol Res**, v. 45, n. 4, p. 357-65, Apr 2012. ISSN 1414-431X (Electronic)

0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22392189> >.

FRIEBE, A.; KOESLING, D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. **Circ Res**, v. 93, n. 2, p. 96-105, Jul 25 2003. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12881475> >.

GALLY, J. A. et al. The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 9, p. 3547-51, May 1990. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2333301> >.

GARTHWAITE, J.; CHARLES, S. L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature**, v. 336, n. 6197, p. 385-8, Nov 24 1988. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2904125> >.

GARTHWAITE, J. et al. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. **Eur J Pharmacol**, v. 172, n. 4-5, p. 413-6, Oct 17 1989. ISSN 0014-2999 (Print)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2555211> >.

GETTING, S. J. et al. Biphasic modulation of GABA release by nitric oxide in the hippocampus of freely moving rats in vivo. **Brain Res**, v. 717, n. 1-2, p. 196-9, Apr 22 1996. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8738273> >.

GRAEFF, F. G. Brain defense systems and anxiety In: ROTH, M.;BURROWS, G. D., *et al* (Ed.). **Handbook of anxiety**. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, v.3, 1990. p.307-354.

GRAEFF, F. G. et al. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. **Behav Brain Res**, v. 58, n. 1-2, p. 123-31, Dec 20 1993. ISSN 0166-4328 (Print)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8136040> >.

GRAY, J. A.; MCNAUGHTON, N. An enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. In: GRAY, J. A. e MCNAUGHTON, N. (Ed.). **The Neuropsychology of Anxiety**. 2ª. Oxford: Oxford Psychology Series, 2000.

GUEVARA-GUZMAN, R.; EMSON, P. C.; KENDRICK, K. M. Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. **J Neurochem**, v. 62, n. 2, p. 807-10, Feb 1994. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7905029> >.

GUIMARAES, F. S. et al. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 8, p. 1313-22, 2005. ISSN 0149-7634 (Print)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16095696> >.

GUIMARAES, F. S. et al. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 103, n. 1, p. 91-4, 1991. ISSN 0033-3158 (Print)

0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1672463> >.

GUIMARAES, F. S. et al. Anxiolytic effect of nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the dorsal central grey. **Neuroreport**, v. 5, n. 15, p. 1929-32, Oct 3 1994. ISSN 0959-4965 (Print) 0959-4965 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7531004> >.

GUIX, F. X. et al. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Prog Neurobiol**, v. 76, n. 2, p. 126-52, Jun 2005. ISSN 0301-0082 (Print) 0301-0082 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16115721> >.

HALL, C. W.; BEHBEHANI, M. M. Synaptic effects of nitric oxide on enkephalinergetic, GABAergic, and glutamatergetic networks of the rat periaqueductal gray. **Brain Res**, v. 805, n. 1-2, p. 69-87, Sep 14 1998. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9733923> >.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 327, n. 1, p. 1-5, Aug 1984. ISSN 0028-1298 (Print) 0028-1298 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6149466> >.

HEIMER, L. A new anatomical framework for neuropsychiatric disorders and drug abuse. **Am J Psychiatry**, v. 160, n. 10, p. 1726-39, Oct 2003. ISSN 0002-953X (Print) 0002-953X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14514480> >.

HOWLETT, A. C. et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. **Pharmacol Rev**, v. 54, n. 2, p. 161-202, Jun 2002. ISSN 0031-6997 (Print) 0031-6997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12037135> >.

JOCA, S. R.; GUIMARAES, F. S. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 185, n. 3, p. 298-305, Apr 2006. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16518647> >.

JU, G.; SWANSON, L. W.; SIMERLY, R. B. Studies on the cellular architecture of the bed nuclei of the stria terminalis in the rat: II. Chemoarchitecture. **J Comp Neurol**, v. 280, n. 4, p. 603-21, Feb 22 1989. ISSN 0021-9967 (Print) 0021-9967 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2468695> >.

KANO, T. et al. Effects of nitric oxide synthase gene knockout on neurotransmitter release in vivo. **Neuroscience**, v. 86, n. 3, p. 695-9, Oct 1998. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9692709> >.

KARANTH, S.; LYSON, K.; MCCANN, S. M. Role of nitric oxide in interleukin 2-induced corticotropin-releasing factor release from incubated hypothalami. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 8, p. 3383-7, Apr 15 1993. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8475085> >.

KAUPP, U. B. The cyclic nucleotide-gated channels of vertebrate photoreceptors and olfactory epithelium. **Trends Neurosci**, v. 14, n. 4, p. 150-7, Apr 1991. ISSN 0166-2236 (Print)

0166-2236 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1710853> >.

KISHIMOTO, T. et al. Deletion of crhr2 reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2. **Nat Genet**, v. 24, n. 4, p. 415-9, Apr 2000. ISSN 1061-4036 (Print)

1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10742109> >.

KRUMENACKER, J. S.; HANAFY, K. A.; MURAD, F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. **Brain Res Bull**, v. 62, n. 6, p. 505-15, Feb 15 2004. ISSN 0361-9230 (Print)

0361-9230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15036565> >.

LANG, P. J.; BRADLEY, M. M.; CUTHBERT, B. N. Emotion, motivation, and anxiety: brain mechanisms and psychophysiology. **Biol Psychiatry**, v. 44, n. 12, p. 1248-63, Dec 15 1998. ISSN 0006-3223 (Print)

0006-3223 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9861468> >.

LAWRENCE, A. J.; JARROTT, B. Nitric oxide increases interstitial excitatory amino acid release in the rat dorsomedial medulla oblongata. **Neurosci Lett**, v. 151, n. 2, p. 126-9, Mar 19 1993. ISSN 0304-3940 (Print)

0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8099432> >.

LEE, S.; KIM, C. K.; RIVIER, C. Nitric oxide stimulates ACTH secretion and the transcription of the genes encoding for NGFI-B, corticotropin-releasing factor, corticotropin-releasing factor receptor type 1, and vasopressin in the hypothalamus of the intact rat. **J Neurosci**, v. 19, n. 17, p. 7640-7, Sep 1 1999. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10460269> >.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 92, n. 2, p. 180-5, 1987. ISSN 0033-3158 (Print)

0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3110839> >.



LITVIN, Y. et al. CRF type 1 receptors in the dorsal periaqueductal gray modulate anxiety-induced defensive behaviors. **Horm Behav**, v. 52, n. 2, p. 244-51, Aug 2007. ISSN 0018-506X (Print)

0018-506X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17540371> >.

LOHSE, M. J.; FORSTERMANN, U.; SCHMIDT, H. H. Pharmacology of NO:cGMP signal transduction. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 358, n. 1, p. 111-2, Jul 1998. ISSN 0028-1298 (Print)

0028-1298 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9721011> >.

LOVENBERG, T. W. et al. Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 3, p. 836-40, Jan 31 1995. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7846062> >.

LOVICK, T. A. Panic disorder - A malfunction of multiple transmitter control systems within the midbrain periaqueductal gray matter? **Neuroscientist**, v. 6, n. 1, p. 48-59, Feb 2000. ISSN 1073-8584. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000086428500013 >.

MARKHAM, C. M. et al. Effects of D-amphetamine on defensive behaviors related to fear and anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 83, n. 4, p. 490-9, Apr 2006. ISSN 0091-3057 (Print)

0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16624396> >.

MATHEUS, M. G.; GUIMARAES, F. S. Antagonism of non-NMDA receptors in the dorsal periaqueductal grey induces anxiolytic effect in the elevated plus maze. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 132, n. 1, p. 14-8, Jul 1997. ISSN 0033-3158 (Print)

0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9272754> >.

MATSUO, I. et al. Glutamate release via NO production evoked by NMDA in the NTS enhances hypotension and bradycardia in vivo. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 280, n. 5, p. R1285-91, May 2001. ISSN 0363-6119 (Print)

0363-6119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11294745> >.

MAYER, B. et al. Brain nitric oxide synthase is a bipterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. **FEBS Lett**, v. 288, n. 1-2, p. 187-91, Aug 19 1991. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1715290> >.

MCELLIGOTT, Z. A.; WINDER, D. G. Alpha1-adrenergic receptor-induced heterosynaptic long-term depression in the bed nucleus of the stria terminalis is disrupted in mouse models of

affective disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 10, p. 2313-23, Sep 2008. ISSN 1740-634X (Electronic)

0893-133X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18046308> >.

MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 28, n. 3, p. 285-305, May 2004. ISSN 0149-7634 (Print)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15225972> >.

MERCHENTHALER, I. Corticotropin releasing factor (CRF)-like immunoreactivity in the rat central nervous system. Extrahypothalamic distribution. **Peptides**, v. 5 Suppl 1, p. 53-69, 1984. ISSN 0196-9781 (Print)

0196-9781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6384954> >.

MIGUEL, T. T.; GOMES, K. S.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Contrasting effects of nitric oxide and corticotropin-releasing factor within the dorsal periaqueductal gray on defensive behavior and nociception in mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 45, n. 4, p. 299-307, Apr 2012. ISSN 1414-431X (Electronic)

0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22450373> >.

MIGUEL, T. T.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Defensive-like behaviors and antinociception induced by NMDA injection into the periaqueductal gray of mice depend on nitric oxide synthesis. **Brain Res**, v. 1076, n. 1, p. 42-8, Mar 3 2006. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16476419> >.

\_\_\_\_\_. Anxiogenic and antinociceptive effects induced by corticotropin-releasing factor (CRF) injections into the periaqueductal gray are modulated by CRF1 receptor in mice. **Horm Behav**, v. 60, n. 3, p. 292-300, Aug 2011. ISSN 1095-6867 (Electronic)

0018-506X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21723867> >.

MOLCHANOV, M. L.; GUIMARAES, F. S. Anxiolytic-like effects of AP7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 160, n. 1, p. 30-8, Feb 2002. ISSN 0033-3158 (Print)

0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11862371> >.

MOREIRA, F. A.; MOLCHANOV, M. L.; GUIMARAES, F. S. Ionotropic glutamate-receptor antagonists inhibit the aversive effects of nitric oxide donor injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 171, n. 2, p. 199-203, Jan 2004. ISSN 0033-3158 (Print)

0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12955288> >.

MORIN, S. M. et al. Differential distribution of urocortin- and corticotropin-releasing factor-like immunoreactivities in the rat brain. **Neuroscience**, v. 92, n. 1, p. 281-91, 1999. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10392850> >.

NAKAMURA, T.; GOLD, G. H. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. **Nature**, v. 325, n. 6103, p. 442-4, Jan 29-Feb 4 1987. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3027574> >.

NEITZ, A. et al. Postsynaptic NO/cGMP increases NMDA receptor currents via hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in the hippocampus. **Cereb Cortex**, v. 24, n. 7, p. 1923-36, Jul 2014. ISSN 1460-2199 (Electronic)

1047-3211 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23448871> >.

NOWICKY, A. V.; BINDMAN, L. J. The nitric oxide synthase inhibitor, N-monomethyl-L-arginine blocks induction of a long-term potentiation-like phenomenon in rat medial frontal cortical neurons in vitro. **J Neurophysiol**, v. 70, n. 3, p. 1255-9, Sep 1993. ISSN 0022-3077 (Print)

0022-3077 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7693883> >.

NUNES-DE-SOUZA, R. L. et al. Role of nitric oxide in the periaqueductal gray in defensive behavior in mice: influence of prior local N-methyl-D-aspartate receptor activation and aversive condition. **Psychology & Neuroscience**, v. 3, p. 59-66, 2010.

OKADA, D. Two pathways of cyclic GMP production through glutamate receptor-mediated nitric oxide synthesis. **J Neurochem**, v. 59, n. 4, p. 1203-10, Oct 1992. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1383419> >.

ONSTOTT, D.; MAYER, B.; BEITZ, A. J. Nitric oxide synthase immunoreactive neurons anatomically define a longitudinal dorsolateral column within the midbrain periaqueductal gray of the rat: analysis using laser confocal microscopy. **Brain Res**, v. 610, n. 2, p. 317-24, May 7 1993. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7686435> >.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. The mouse brain in stereotaxic coordinates. In: (Ed.). California, USA: Academic Press, 2001.

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-67, Aug 1985. ISSN 0165-0270 (Print)

0165-0270 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2864480> >.

PERRIN, M. et al. Identification of a second corticotropin-releasing factor receptor gene and characterization of a cDNA expressed in heart. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 7, p. 2969-73, Mar 28 1995. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7708757> >.

PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 11, p. 873-84, Nov 2003. ISSN 1471-003X (Print)

1471-003X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14595399> >.

PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Prog Neurobiol**, v. 64, n. 1, p. 51-68, May 2001. ISSN 0301-0082 (Print)

0301-0082 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11250062> >.

RABER, J.; KOOB, G. F.; BLOOM, F. E. Interleukin-2 (IL-2) induces corticotropin-releasing factor (CRF) release from the amygdala and involves a nitric oxide-mediated signaling; comparison with the hypothalamic response. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 272, n. 2, p. 815-24, Feb 1995. ISSN 0022-3565 (Print)

0022-3565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7853199> >.

RADI, R. et al. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **Arch Biochem Biophys**, v. 288, n. 2, p. 481-7, Aug 1 1991. ISSN 0003-9861 (Print)

0003-9861 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1654835> >.

RIVIER, C. Role of gaseous neurotransmitters in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 933, p. 254-64, Mar 2001. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12000026> >.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: COOPER, S. J. e HENDRIE, C. A. (Ed.). **Ethology and Psychopharmacology**, 1994. p.9-44.

ROSEN, J. B.; SCHULKIN, J. From normal fear to pathological anxiety. **Psychol Rev**, v. 105, n. 2, p. 325-50, Apr 1998. ISSN 0033-295X (Print)

0033-295X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9577241> >.

SAHUQUE, L. L. et al. Anxiogenic and aversive effects of corticotropin-releasing factor (CRF) in the bed nucleus of the stria terminalis in the rat: role of CRF receptor subtypes. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 186, n. 1, p. 122-32, May 2006. ISSN 0033-3158 (Print)

0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16568282> >.

SAKANAKA, M.; SHIBASAKI, T.; LEDERIS, K. Corticotropin releasing factor-like immunoreactivity in the rat brain as revealed by a modified cobalt-glucose oxidase-diaminobenzidine method. **J Comp Neurol**, v. 260, n. 2, p. 256-98, Jun 8 1987. ISSN 0021-9967 (Print)

0021-9967 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3497182> >.

SCHENBERG, L. C. et al. A panic attack-like unusual stress reaction. **Horm Behav**, v. 54, n. 5, p. 584-91, Nov 2008. ISSN 1095-6867 (Electronic)

0018-506X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18423636> >.

SCHMIDT, H. H.; LOHMANN, S. M.; WALTER, U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. **Biochim Biophys Acta**, v. 1178, n. 2, p. 153-75, Aug 18 1993. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7688574> >.

SCHULKIN, J.; MORGAN, M. A.; ROSEN, J. B. A neuroendocrine mechanism for sustaining fear. **Trends Neurosci**, v. 28, n. 12, p. 629-35, Dec 2005. ISSN 0166-2236 (Print)

0166-2236 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16214230> >.

SCHWEIGHOFER, N.; FERRIOL, G. Diffusion of nitric oxide can facilitate cerebellar learning: A simulation study. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 19, p. 10661-5, Sep 12 2000. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10984547> >.

SECCIA, M. et al. Inhibition of Cu<sup>2+</sup>-induced LDL oxidation by nitric oxide: a study using donors with different half-time of NO release. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 220, n. 2, p. 306-9, Mar 18 1996. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8645301> >.

SEGIETH, J. et al. Nitric oxide regulates excitatory amino acid release in a biphasic manner in freely moving rats. **Neurosci Lett**, v. 200, n. 2, p. 101-4, Nov 17 1995. ISSN 0304-3940 (Print)

0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8614554> >.

SEGOVIA, G.; MORA, F. Role of nitric oxide in modulating the release of dopamine, glutamate, and GABA in striatum of the freely moving rat. **Brain Res Bull**, v. 45, n. 3, p. 275-9, 1998. ISSN 0361-9230 (Print)

0361-9230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9510419> >.

SMITH, G. W. et al. Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. **Neuron**, v. 20, n. 6, p. 1093-102, Jun 1998. ISSN 0896-6273 (Print)

0896-6273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9655498> >.

SOUTHAM, E.; EAST, S. J.; GARTHWAITE, J. Excitatory amino acid receptors coupled to the nitric oxide/cyclic GMP pathway in rat cerebellum during development. **J Neurochem**, v. 56, n. 6, p. 2072-81, Jun 1991. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1673999> >.

STEPHENS, D. N. et al. Does the excitatory amino acid receptor antagonist 2-APH exhibit anxiolytic activity? **Psychopharmacology (Berl)**, v. 90, n. 2, p. 166-9, 1986. ISSN 0033-3158 (Print)

0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2878456> >.

SWANSON, L. W. et al. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. **Neuroendocrinology**, v. 36, n. 3, p. 165-86, 1983. ISSN 0028-3835 (Print)

0028-3835 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6601247> >.

TAKAHASHI, L. K. et al. Antagonism of CRF(2) receptors produces anxiolytic behavior in animal models of anxiety. **Brain Res**, v. 902, n. 2, p. 135-42, Jun 1 2001. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11384606> >.

TIMPL, P. et al. Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. **Nat Genet**, v. 19, n. 2, p. 162-6, Jun 1998. ISSN 1061-4036 (Print)

1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9620773> >.

VAN PETT, K. et al. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. **J Comp Neurol**, v. 428, n. 2, p. 191-212, Dec 11 2000. ISSN 0021-9967 (Print)

0021-9967 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11064361> >.

VINCENT, S. R.; KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. **Neuroscience**, v. 46, n. 4, p. 755-84, 1992. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1371855> >.

VITA, N. et al. Primary structure and functional expression of mouse pituitary and human brain corticotrophin releasing factor receptors. **FEBS Lett**, v. 335, n. 1, p. 1-5, Nov 29 1993. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8243652> >.

WALKER, P.; CARRIVE, P. Role of ventrolateral periaqueductal gray neurons in the behavioral and cardiovascular responses to contextual conditioned fear and poststress recovery. **Neuroscience**, v. 116, n. 3, p. 897-912, 2003. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12573728> >.

WILSON, T. E. et al. Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. **Science**, v. 252, n. 5010, p. 1296-300, May 31 1991. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1925541> >.

WOOD, P. L. et al. Inhibition of nitric oxide synthase blocks N-methyl-D-aspartate-, quisqualate-, kainate-, harmaline-, and pentylentetrazole-dependent increases in cerebellar cyclic GMP in vivo. **J Neurochem**, v. 55, n. 1, p. 346-8, Jul 1990. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1693947> >.

YANG, M. et al. The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. **Physiol Behav**, v. 81, n. 3, p. 465-73, May 2004. ISSN 0031-9384 (Print)

0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15135018> >.

YUN, H. Y.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. **Mol Psychiatry**, v. 2, n. 4, p. 300-10, Jul 1997. ISSN 1359-4184 (Print)

1359-4184 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9246670> >.

ZANGROSSI, H., JR.; GRAEFF, F. G. Modelos Animais. In: HETEM, L. A. B. e GRAEFF, F. G. (Ed.). **Transtornos de Ansiedade**. 1ª. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. p.55-73.